UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DES CHALKONSYNTHASE-GENS VON MATTHIOLA INCANA UND ZUR KLONIERUNG VON PFLANZENGENEN IN VERSCHIEDENEN VEKTORSYSTEMEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MONIKA FREY

aus Tübingen

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0001

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DES CHALKONSYNTHASE-GENS VON MATTHIOLA INCANA UND ZUR KLONIERUNG VON PFLANZENGENEN IN VERSCHIEDENEN VEKTORSYSTEMEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Monika Frey
aus Tübingen

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	26. März 1984
Dekan:	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Hemleben
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Seyffert

Frau Prof. Dr. Vera Hemleben danke ich herzlich für ihre wissenschaftliche Unterstützung, für ihre Anteilnahme an auftretenden Problemen und die jederzeit gewährten Hilfen.

Für die Überlassung der Bakterienklone LF 12 und LF 56 und für wertvolle Hinweise danke ich Herrn Prof. Dr. K. Hahlbrock und Herrn Dr. F. Kreuzaler.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. N. Murray, Herrn Dr. E. Jacob und Herrn Dr. H. Jäckle, von denen ich weitere Bakterien- und Phagenstämme erhielt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Wienand, der mich während eines zweiwöchigen Aufenthalts am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Abtl. Saedler, in die Kunst der Phagenklonierung einführte und jederzeit bereit war, auf meine Fragen und Probleme einzugehen.
Herrn Prof. Dr. H. Saedler danke ich dafür, daß er mir diesen Aufenthalt an seinem Institut ermöglichte.

Frau J. Gerstner danke ich für eine Einführung in die Kinasetechnik und für das Bereitstellen von gereinigter 18S- und 25S-rRNS.

Frau Dr. C. Menne und Herrn Dr. A. Brennicke verdanke ich anregende wissenschaftliche Diskussionen und hilfreiche Ratschläge.

Für sein großes Engagement beim Fertigstellen der Arbeit möchte ich mich bei Herrn M. Kittel bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Interesse und die menschliche Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich Frau A. Eble, Herrn M. Koch, Frau Dr. B. Lewecke und Frau Dr. S. Rall für ihre Geduld und Freundschaft danken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Pflanzenmaterial, Bakterien- und Phagenstämme	15
2.1.1.	Pflanzenmaterial	15
2.1.1.1.	Matthiola incana	15
2.1.1.2.	Antirrhinum majus	15
2.1.1.3.	Anzucht der Pflanzen	16
2.1.2.	Bakterienstämme	16
2.1.3.	Phagenstämme	17
2.2.	Isolierung von Nukleinsäuren	17
2.2.1.	Isolierung von Pflanzen-DNS	17
2.2.1.1.	Reinigung von Pflanzen-DNS über CsCl- und CsCl-Actinomycin D-Dichtegradienten	17
2.2.1.2.	Reinigung über CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten	18
2.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNS	18
2.2.2.1.	Miniscreen zur schnellen Präparation von Plasmid-DNS	18
2.2.3.	Isolierung von Phagen-DNS	19
2.2.3.1.	Anzucht der Phagen	19
2.2.3.1.1.	Anzucht von Indikatorbakterien ("100-fach Bakterien")	19
2.2.3.1.2.	Herstellung eines Ausgangslysats	19
2.2.3.1.3.	Anzucht von Phagen im großen Maßstab	19
2.2.3.2.	Konzentrierung der Phagen	19
2.2.3.2.1.	Zentrifugation	19
2.2.3.2.2.	PEG-Vernetzung	20
2.2.3.3.	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	20
2.2.3.3.1.	Kontinuierliche CsCl-Gradienten	20
2.2.3.3.2.	CsCl-Stufengradienten	20
2.2.3.4.	Reinigung der Phagen-DNS	21
2.2.3.4.1.	Aufschluß mit Proteinase K	21
2.2.3.4.2.	Aufschluß mit Formamid	21
2.2.3.5.	Schnelle Phagen-DNS-Präparation	22

2.2.4.	Isolierung von RNS aus Matthiola-Blüten	22
2.2.4.1.	Aufarbeitung der Blüten	22
2.2.4.2.	Saccharosegradientenzentrifugation der RNS	23
2.2.4.3.	Isolierung von Poly(A)$^+$-RNS über Poly(U)-Sepharose	23
2.3.	Vorbereitung von DNS zur Klonierung und Hybridisierung	24
2.3.1.	Restriktionsabbau von DNS	24
2.3.2.	Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Transfer	24
2.3.3.	Fixierung von DNS auf Rundfiltern	24
2.3.4.	Partieller Abbau von Matthiola-DNS mit Restriktionsenzymen	24
2.3.5.	Abbau von Phagen-DNS mit Restriktionsenzymen	25
2.3.5.1.	Schnelle Isopropanolfällung zur biochemischen Selektion beim Phagen λEMBL 3A	25
2.3.5.2.	Ligation der Phagen-Arm-Fragmente zur Zentrifugation auf Saccharosegradienten	25
2.3.6.	Saccharosegradientenzentrifugation	26
2.3.6.1.	Saccharosegradientenzentrifugation zur Isolierung der cDNS-Sequenz aus pLF 12 und pLF 56	26
2.3.6.2.	Saccharosegradienten zur Auftrennung vollständig abgebauter Matthiola-DNS	26
2.3.6.3.	Saccharosegradienten zur Abtrennung des Phagen-DNS-Mittelfragments von den Phagen-Armen (λgtWES, λNM 762)	27
2.3.7.	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen	27
2.4.	Klonierung	28
2.4.1.	Klonierung im Plasmid-System	28
2.4.1.1.	Ligation	28
2.4.1.2.	Transformation	28
2.4.1.3.	Koloniehybridisierung	28
2.4.2.	Klonierung im Phagen-System	29
2.4.2.1.	Herstellung der Verpackungsextrakte	29
2.4.2.2.	Ligation	31
2.4.2.3.	Verpackung in vitro ligierter DNS	31
2.4.2.4.	Screening der gebildeten Phagen	31
2.5.	Hybridisierung	32
2.5.1.	Herstellung radioaktiv markierter Proben	32

2.5.1.1.	Nicktranslation zur Markierung von DNS	32
2.5.1.2.	Kinasereaktion zur Endmarkierung von RNS mit γ-^{32}P-ATP	33
2.5.1.2.1.	Alkalische Hydrolyse der RNS	33
2.5.1.2.2.	Endmarkierung mit T_4-Polynukleotidkinase	33
2.5.2.	Hybridisierungsbedingungen	34
2.5.2.1.	Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNS	34
2.5.2.2.	Hybridisierung mit ^{32}P-markierter RNS	35
2.5.2.3.	Entfernen von ^{32}P-markierter RNS von Nitrozellulosefiltern	35
2.6.	Aufnahme von Schmelzkurven	36
2.7.	Puffer und Lösungen	37
2.8.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	41
2.8.1.	Chemikalien	41
2.8.2.	Enzyme	42
2.8.3.	Nährmedien	43
2.8.4.	Verbrauchsmaterialien	43
2.9.	Abkürzungen	44
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Hybridisierung	45
3.1.1.	Hybridisierungsbedingungen	45
3.1.2.	Hybridisierungsmuster	47
3.1.3.	Vergleich der Hybridisierung von pBR 322- und pLF 56-Insert-DNS mit DNS aus Matthiola incana	53
3.1.4.	Spothybridisierung	58
3.1.5.	Schmelzkurven	60
3.1.6.	Hybridisierung bei für pLF 56-DNS/Matthiola-DNS-Hybride optimierten Bedingungen (Hybridisierungsbedingungen III)	66
3.1.7.	Vergleich der Hybridisierungsantwort von Matthiola- und Antirrhinum-DNS bei Hybridisierung mit pBR 322- bzw. pLF 56-Insert-DNS	68
3.1.8.	Versuche zur Entfernung von pBR 322-Sequenzen aus dem Hybridisierungsansatz	72
3.1.9.	Mengeneffekte bei der Hybridisierung	73
3.2.	Klonierung von Matthiola-DNS	73
3.2.1.	Klonierung im Plasmid pBR 325	73

3.2.2.	Klonierung in Phagenvektoren	83
3.2.2.1.	In-vitro-Reaktionen zur Bildung rekombinanter Phagen	86
3.2.2.1.1.	Anzucht von Klonierungsphagen und Reinigung der Phagen-DNS	86
3.2.2.1.2.	Vorbereitung der Phagen-DNS zur Klonierung	88
3.2.2.1.3.	In-vitro-Ligation von Phagen-DNS und Matthiola-DNS	92
3.2.2.1.4.	Verpackung in vitro ligierter DNS	94
3.2.2.2.	Ausbeuten rekombinanter Phagen in verschiedenen Phagen-Systemen	97
3.2.2.3.	Charakterisierung des rekombinanten Phagen λEM 19/1012, Eigenschaften des rekombinanten Phagen λEM 16/1411	105
4.	Diskussion	118
5.	Zusammenfassung	143
6.	Literaturverzeichnis	146

1. EINLEITUNG

Zwei Klassen regulatorischer Phänomene können bei Organismen beobachtet werden. Die eine stellt die Antwort einer Zelle auf Veränderungen der Umwelt oder endogener Faktoren dar und betrifft oft die Aktivität und Konzentration von Enzymen; diese Kurzzeitregulation ist voll revertierbar. Die andere Regulationsklasse wirkt bis auf Ausnahmen (Tumorbildung) dauernd und kann nicht rückgängig gemacht werden. Dieser Regulationstyp ist eng verbunden mit der Differenzierung und ist ausschlaggebend für die zahllosen Schritte, die aus einer befruchteten Eizelle einen Organismus mit einer Vielzahl von Zellen entstehen lassen, die alle unterschiedliche, meist unveränderliche Rollen zum Erhalt des Ganzen ausfüllen. Auch differenzierte Zellen unterliegen weiter der Kurzzeitregulation. Diese beiden Vorgänge, Differenzierung und Kurzzeitregulation, haben bei Tieren, Pflanzen, niederen Eukaryonten und Prokaryonten unterschiedlich große Bedeutung.
Der wesentliche Unterschied beider Prozesse liegt in Zeitpunkt und Umfang der Festlegung einer Zelle auf eine Reaktionsnorm - zugrunde liegt in jedem Fall differentielle Aktivierung oder Inaktivierung definierter Gene. Diese Regulation kann an verschiedenen Stellen des Informationsflusses von der codierenden DNS zum aktiven Protein stattfinden (Abb. 1).
Die letzte Stufe bildet die Posttranslationskontrolle. Sie umfaßt die Modifikation von Proteinen, ihre Phosphorylierung, Acylierung und Glycosylierung (Beispiele: Histone, Serfling, 1982; Wirkung der Oncogene und des epidermalen Wachstumshormons, Bishop, 1982; Alberts, 1983), die Aktivierung von Proteinen durch Abspaltung von Peptiden (Lysozym, Conalbumin, Thibodeau, 1978; ß-Endrophin, Li, 1982), die Zusammenlagerung von Peptidketten, aber auch die Abbaurate von Proteinen (Matile, 1982).

Bei Transkription gebildete RNS ist meist nicht funktionsfähig. Erst Modifikation von Basen (tRNS), Addition von Nukleotiden (Poly(A), CCA-Sequenz der tRNS), Processing eines primären Transkripts (rRNS), Processing und Splicing der hnRNS führen zu

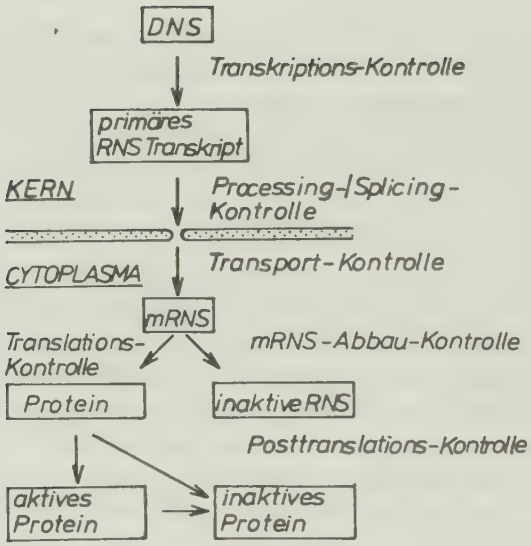


Abbildung 1: Regulationsstufen bei eukaryontischen Genen.

RNS-Molekülen, die biologisch aktiv sind (z.B. Grierson, 1983). Damit sind verschiedene Angriffspunkte für posttranskriptionelle Regulation gegeben. Da die nach der Transkription gebildeten 3'-Poly(A)-Sequenzen und die 5'-"cap"-Struktur Einfluß auf die Halbwertszeit und Translationshäufigkeit einer mRNS Spezies haben, liegt in ihrer Synthese eine wichtige Kontrollmöglichkeit (Huez et al., 1981). Daneben bestehen weitere Mechanismen, die Teile der gebildeten RNS von der Translation ausschließen können (z.B. Hitzeschock-Wirkung, Krüger et al., 1981).
Die Trennung von Transkriptionsort (Zellkern) und Translationsort (Cytoplasma) bei Eukaryonten liefert eine weitere Möglichkeit der Regulation, denn vor ihrer Realisation muß eine in RNS geschriebene und im Ribonukleoproteinkomplex im Kern festgelegte Information durch die Kernporen transportiert werden (Trans-

port-Kontrolle). Transport und Entfernung von Intronsequenzen scheinen eng miteinander verbunden zu sein; kleiner nukleärer RNS wird dabei eine wesentliche Rolle zugeschrieben (Zieve et al., 1981; Lerner et al., 1981). Diese Vorgänge stellen eine wichtige Schaltstelle des Regulationssystems dar, denn die nukleären hnRNS Populationen unterschiedlich differenzierter Zellen unterscheiden sich weit weniger als die der cytoplasmatischen mRNS (Goldberg et al., 1978; Davidson und Britten, 1979).

In der DNS eines Organismus ist die ihm zur Verfügung stehende Information festgelegt, jede RNS stammt von einer komplementären DNS-Sequenz ab, und ihre Freigabe zur Transkription ist Voraussetzung für alle bisher erwähnten Prozesse. Transkriptionskontrolle spielt daher eine bedeutende Rolle bei der differentiellen Genexpression.
Variierende Transkriptionsraten von Genen können durch unterschiedlichen DNS-Gehalt erreicht werden. Dies kann dadurch geschehen, daß DNS-Sequenzen aus den Zellkernen einzelner Zellen ausgeschlossen werden (Ascaris, Strickberger, 1976; Cyclops, Beermann, 1977), oder dadurch, daß sie amplifiziert vorliegen. Amplifikation von Gensequenzen tritt in differenzierten Zellen auf: in den Riesenchromosomen der Dipteren, wo sie weite Genbereiche umfaßt, oder in den Oocyten-Nährzellen von Drosophila; hier betrifft sie nur die Chorion-Gene (Spradling, 1980). Entwicklungsspezifisch amplifiziert findet man die rDNS von Amphibien (Bird, 1978). Die Antwort der Zelle auf ein äußeres Signal kann ebenfalls in der Vervielfältigung einer Gensequenz bestehen. Dies wurde für die Methotrexat-Resistenz in Mäusemyelomazellen gezeigt (Schimke, 1980). Diese Mechanismen der Transkriptionskontrolle scheinen aber selten verwirklichte Regulationsprinzipien zu sein.
Wichtiger sind Prinzipien, die auf allgemeinen Strukturen eukaryontischer DNS beruhen. Es sind dies Promotorstrukturen, die Aufreihung von repetitiven und unikalen DNS-Abschnitten, die Chromatinstruktur und eine Methylierung von DNS, die mit der Aktivität von Genen in Verbindung gebracht wird.
Als DNS-Sequenzen, die die Ableseraten und den Ablesebeginn von mRNS codierenden Sequenzen bestimmen, wurden Nukleotid-Folgen

80-100 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart, die "CAAT-Box", die "ATA-Box" und das "cap"-Signal identifiziert (Corden, 1980; Breathnach, 1981). Veränderungen in ihrem Bereich führen zu veränderten Transkripten und Transkriptionsraten (Wasylyk et al., 1980). Daneben können sogenannte Enhancer-Sequenzen, die bei Viren, aber auch bei Immunglobulin-Genen gefunden werden, über weite Distanz hinweg die Transkription stimulieren (Banerji et al., 1981, 1983; Wasylyk et al., 1983; Queen et al., 1983; Gillies et al., 1983).

Die DNS von Säugern besteht bis zu 30%, die von einigen Pflanzen bis zu 95% aus hoch- und mittelrepetitiver DNS (10^4-10^6fach pro Genom; bis 10^4fach pro Genom, Nagl, 1976; Wenzel und Hemleben, 1982a); sie ist in definierten Mustern (Drosophila-, Xenopus-Interspersionsmuster, Wu et al., 1972; Davidson und Hough, 1973; Singer, 1982) zwischen unikalen DNS-Bereichen verteilt. Ihr wird in einem Modell von Britten und Davidson (1969) im System von übergeordneten Regulatorgenen und abhängigen Strukturgenen eine regulatorische Funktion zugeordnet. Ein solches System würde die koordinierte Aktivierung von ineinander greifenden Genen eines Stoffwechselweges erklären.

Es ist offensichtlich, daß die komplexe DNS-Protein-Bindung an den Nukleosomen Einfluß auf die Zugänglichkeit der DNS für RNS-Polymerase und damit auf die Transkription von Genen hat. Diese Zugänglichkeit kann direkt durch die Wirkung DNS-abbauender Enzyme (Micrococcusnuklease, S1-Nuklease, DNase I) gezeigt werden (z.B. Noll et al., 1976; Larsen und Weintraub, 1982). Es wurde eine Korrelation zwischen Aktivität von Genen und Empfindlichkeit für diese Enzyme gefunden (Weintraub et al., 1976; Garel et al., 1977; Elgin et al., 1981; McGhee et al., 1981; Zachau et al., 1981; Mathis et al., 1980; Weisbrod, 1982).

Es ist allerdings schwierig, zu entscheiden, ob eine Veränderung des Chromatins die Aktivierung des Gens zur Folge hat, oder ob ein zur Transkription aktiviertes Gen die Lockerung der Nukleosomenstruktur induziert. Die Art der Bindung der Nukleosomen an die DNS hängt mit von der Sekundärstruktur der DNS ab (McGhee und Felsenfeld, 1983; Weintraub, 1983; Smith et al., 1981) und wird durch mit Histonen assoziierte Proteine

verändert (HMG-Proteine, Weisbrod et al., 1980; Sandee et al., 1981).
Eine weitere Möglichkeit, Gene zu aktivieren, besteht in der Veränderung ihrer Lage im Genom (z.B. variable Oberflächen-Glycoprotein-Gene der Trypanosomen, Borst et al., 1982; Hefe-MAT-Locus, Kushner et al., 1979). Die DNS-Umgebung, in der nun Transkriptionsinitiation erfolgt, zeichnet sich durch DNase I-Empfindlichkeit aus, enthält aber unter Umständen auch starke Promotor-Sequenzen.
Methylierung der Eukaryonten-DNS liegt z.T. in "Clustern" vor; so ist die nicht transkribierte Satelliten-DNS von Pflanzen stark methyliert (Deumling, 1981; Hemleben et al., 1982). Eine direkte Beziehung von Methylierungsgrad und Aktivität von Genen kann in verschiedenen Systemen festgestellt werden (Razin et al., 1980; Felsenfeld et al., 1982; Harbers et al., 1982; Leweke und Hemleben, 1982). Für einige Gene konnte gezeigt werden, daß die Methylierung der 5'-Region des Gens absolut notwendig ist für seine Transkription, es liegen jedoch auch gegensätzliche Befunde vor (Kuo et al., 1979; Mandl et al., 1979; Busslinger, 1983; McKeon et al., 1982). Methylierungsmuster eines Gens können sich auf unterschiedlichen Differenzierungsstufen und in verschiedenen Organen unterscheiden (Jähner et al., 1982); die Muster können in semikonservativer Form vererbt werden, und damit bietet sich Methylierung als Mechanismus der Differenzierung an (Wigler et al., 1981; Gruenbaum et al., 1982).

Wie die bisher erkannten Regulationsmechanismen der RNS-Transkription und der nachgeschalteten Regulationsstufen eingeschaltet werden und bei der Differenzierung und induzierter Kurzzeitregulation zusammenspielen, ist schwer zu bestimmen, denn in den Zellen läuft gleichzeitig eine Vielzahl von Reaktionen ab. Bei mehrzelligen Organismen steht zusätzlich jede Zelle unter dem Einfluß ihrer Nachbarzellen. Um hier den Zusammenhang zwischen auslösendem Impuls und Zellantwort zu finden, müssen beide zu fassen sein. Relativ einfach ist dies, wenn ein einheitliches Zellsystem zur Verfügung steht (Hefekulturen, tierische und pflanzliche Zellkulturen). Ein einfaches und einheitliches Modell für Differenzierungsprozesse bilden Schleimpilze

(Dictyostelium, Mehdy et al., 1983). Gut untersucht ist bei höheren Tieren der Einfluß, den Hormone auf Zellsysteme haben (Steroidhormone von Dipteren und Säugern, Yamamoto et al., 1976; Savakis et al., 1980; Evans et al., 1981). Gabe von Ecdyson bewirkt bei Dipteren die Transkription bestimmter Gene; dies findet seinen Ausdruck in der Bildung definierter "Puffs" der polytänen Riesenchromosomen (Bonner und Pardue, 1976). Bei Drosophila wurde entdeckt, daß als Reaktion auf erhöhte Kulturtemperaturen sogenannte Hitzeschock-Proteine gebildet werden (Ritossa , 1962). Die Regulationsmechanismen liegen in diesem Fall auf Transkriptions- und Translationsebene (Spradling et al., 1977; Stori et al., 1980; DiDomenico et al., 1982). Wie im Fall der Ecdysonwirkung bei Drosophila können primäre und sekundäre Transkripte festgestellt werden (Arrigo, 1980). Neuere Untersuchungen zeigen, daß die so induzierten Gene z.T. auch entwicklungsspezifisch angeschaltet werden (Zimmerman et al., 1983), und auf molekularer Ebene wurden "Hitzeschock-typische" Promotorstrukturen identifiziert (Karch et al., 1981).

Ähnlich gut untersucht wie die Hormonwirkung bei Tieren ist der Einfluß, den Licht auf Stoffwechselprozesse bei Pflanzen hat. Ein Lichtaufnahme-System bildet das Phytochrom (Mohr, 1980); es ist unter anderem Vermittler zwischen Lichtsignal und Stimulierung der mRNS-Synthese bei der Bildung des Kern-codierten Chlorophyll a/b Light-harvesting Proteins (Apel, 1978). Licht induziert über das Phytochrom und über einen Blaulicht-Rezeptor die Bildung von Flavonoiden in Petersilie-Zellkulturen (Duell-Pfaff und Wellmann, 1982; Wellmann und Schopfer, 1975). Folge des Lichtimpulses ist in Petersilie-Zellkulturen eine gesteigerte enzymatische Aktivität der an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Enzyme, der eine verstärkte Transkription der spezifischen mRNS vorausgeht (Hahlbrock und Grisebach, 1979; Schröder et al., 1979). Neben Licht kann in Zellkulturen (Petersilie, Glycine, Phaseolus) auch ein Elicitor, gebildet aus dem Pilz Phytophtera megasperma, zur Induktion von Enzymen der Flavonoid-Biosynthese eingesetzt werden (Zähringer et al., 1978; Hahlbrock et al., 1981), und bei einem Teil der Enzyme (Gruppe I-Enzyme,

s.u.) auch der Streß, der auf eine Zellkultur ausgeübt wird, wenn man diese verdünnt (Hahlbrock, 1981).
Die aus den Flavonoiden gebildeten Anthocyane werden in der Pflanze vorwiegend in bestimmten Organen gebildet, den Blüten. Sie sind damit Stoffe, deren Synthese im Laufe der Differenzierung auf bestimmte Zellen beschränkt wird (Wiermann, 1981) - allerdings können auch Blätter und Stengel Anthocyane bilden. Die Anthocyan-Biosynthese erfolgt in der Blüte von Matthiola incana und den Antheren von Tulpen nach einem zeitlichen Muster. Definierten Entwicklungsstadien entsprechen deshalb bestimmte Aktivitäten der Enzyme der Flavonoid-Biosynthese (Spribille, 1982; Dangelmayr et al., 1983; Rall, 1983; Süttfeld et al., 1978). Einen festgelegten Verlauf der Enzymaktivitäten findet man auch bei der Keimung von Petersilie und Matthiola (Hahlbrock et al., 1971; Rall, 1983; Hemleben et al., 1982a).

Die Flavonoide sind Endprodukte einer Synthesekette des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, der ausgeht von Phenylalanin (Conn, 1981). Auf Grund ihrer Stellung im Sekundärstoffwechsel und ihrer Induktionskinetik in Petersilie-Zellkulturen lassen sich die Enzyme der Flavonoid-Biosynthese in zwei Gruppen einteilen (Hahlbrock et al., 1976). Gruppe I-Enzyme leisten Synthesen bis zu den aktivierten Zimtsäuren; diese sind Zwischenprodukte der Flavonoid-, aber auch der Lignin-, Cumarin-, Phytoalexin- und anderer Synthesen. Die Phenylalanin-Ammonium Lyase (PAL, EC 4.3.1.5.) als typischer Vertreter der Gruppe I-Enzyme erreicht bei Lichtinduktion nach 6-9 Stunden in Petersilie-Zellkulturen ihr Aktivitätsmaximum (Schröder et al., 1979), in Kalluskulturen von Matthiola incana nach 6-10 Stunden (Rall, 1983). Bei Gruppe II-Enzymen, etwa der Chalkonsynthase (EC 5.5.1.6.2), liegt das Maximum in Petersilie-Zellkulturen bei 10-12 Stunden nach Induktion (Schröder et al., 1979). Im Gegensatz zu den Enzymen der Gruppe I werden Gruppe II-Enzyme ausschließlich für Synthesen auf dem Weg zu den Flavonoiden gebraucht.
Die Chalkonsynthase als erstes Gruppe II-Enzym ist das Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese; sie verknüpft drei Malonyl-CoA-Reste mit einer aktivierten Zimtsäure, so daß das C_{15}-

Grundgerüst der Flavonoide entsteht (Grisebach und Barz, 1969; Kreuzaler und Hahlbrock, 1975). Das entstehende Chalkon ist oft nicht zu fassen, da es durch spontane und enzymatische Isomerisierung sofort ins Flavanon überführt wird. Deshalb war erst mit Einsatz von mutierten Pflanzenlinien der Nachweis des Chalkons als erstem Reaktionsprodukt möglich (Kuhn et al., 1978, im Gegensatz zu Kreuzaler und Hahlbrock, 1975).
Bis das Endprodukt der Flavonoid-Biosynthese gebildet ist, müssen in Petersilie-Zellkulturen mindestens 16 Enzyme zusammenwirken (Hahlbrock, 1981).
Damit bilden die Gene der Enzyme der Flavonoid-Biosynthese der Pflanzen Prototypen regulierter Gene:

- ihre Aktivierung erfolgt als Antwort auf einen Reiz (Licht, Kälte, Elicitor),
- ihre Hauptaktivität wird während der Differenzierung auf bestimmte Organe und Entwicklungsstadien beschränkt,
- ihre Regulation findet (bei Petersilie-Zellkulturen) auf Transkriptionsebene statt,
- Reizantwort und die Mechanismen der Differenzierung führen zur koordinierten Aktivierung mehrerer Enzyme.

Zu diesen an sich schon interessanten Aspekten der Flavonoid-Biosynthese kommt, daß Mutationen, die die Aktivität eines Enzyms betreffen zur Veränderung oder zum Fehlen der Anthocyane der Blüte führen und dieser augenscheinliche Effekt eine genetische Untersuchung erleichtert. So wurden für Petunia hybrida, Antirrhinum majus, Silene diotica und Matthiola incana in bezug auf die Gene der Anthocyan-Biosynthese definierte Linien etabliert. Für Matthiola incana gibt es in Tübingen Linien, die homozygot für Mutationen sind, die verschiedene Enzyme der Anthocyan-Biosynthese betreffen (Seyffert, 1971). Die meisten dieser Linien unterscheiden sich in ihrem Modifikationsmuster; dies wird durch die Gene b, l, u, v bestimmt (Abb. 2b; Seyffert, 1960, 1962, 1982; Forkmann, 1980). Dagegen fehlt den weiß blühenden Stämmen 17, 18, 19 ein Wildtypallel der Gene e, f oder g (Abb. 2, Tab. 1). Während dem Fehlen der Blütenfärbung bei den Stämmen 17 und 19 bisher keine fehlende Enzymaktivität zugeordnet werden kann, findet man in der Linie 18 keine Chalkonsynthase-Aktivität.

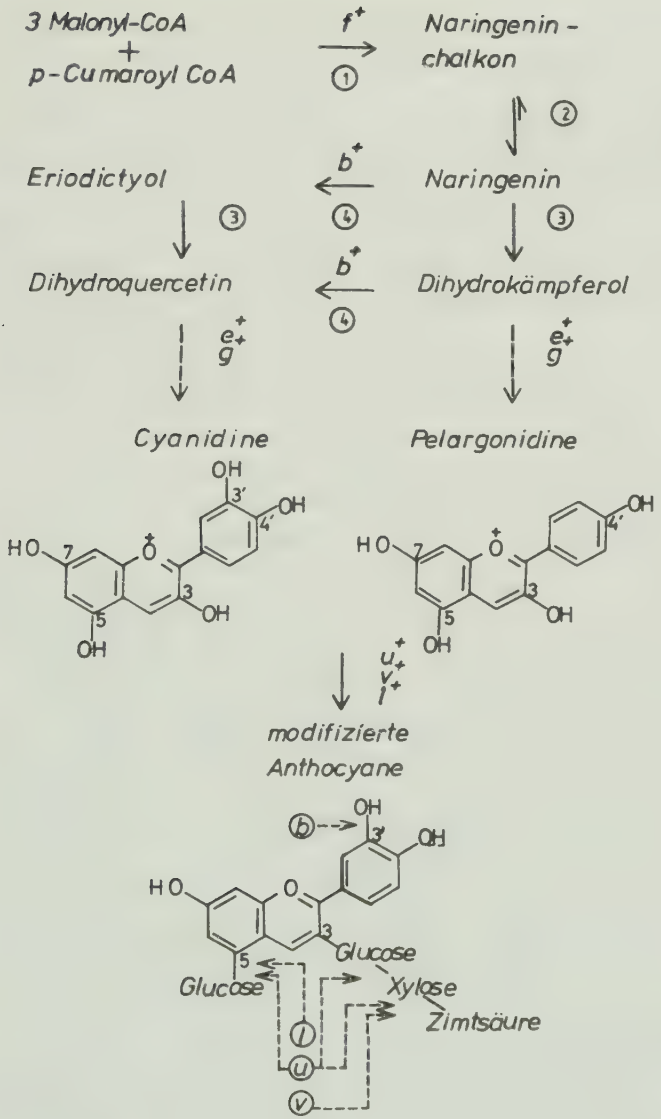


Abbildung 2: Wirkort der Gene e, f, g und b, l, u, v, im Anthocyanbiosyntheseweg bei Matthiola incana.

① Chalkonsynthase
② Chalkonisomerase
③ 3-Hydroxylase
④ 3'-Hydroxylase

Supplementationsversuche bestätigten, daß das Gen f dem Chalkonsynthase-Gen entspricht (Forkmann, 1977; Spribille und Forkmann, 1981).

Mutationen können auf molekularer Ebene die Funktionsweise von Genen erklären. Mutanten mit anormalem Protein zeigen Funktionsstrukturen innerhalb eines Proteins auf ("aktive Zentren"), aber auch funktionelle Bereiche auf DNS-Ebene können durch Mutationen aufgeklärt werden. Deshalb sollte ein auf DNS-Ebene durchgeführter Vergleich der im Gen f mutierten Matthiola-Linie 18 mit in bezug auf die Chalkonsynthase-Aktivität nicht mutierten Linien (z.B. Linie 04, 06, 17) weiteren Aufschluß über die Enzymstruktur oder die Regulation des Gens geben (vgl. Rall, 1983). Das Chalkonsynthase-Gen von Matthiola incana ist aber vor allem interessant als Beispiel für ein Gen, dessen Charakterisierung auf DNS-Ebene Einblicke in die Mechanismen der Kurzzeitregulation und Differenzierung gewähren sollte.

Die einfachste Art der Charakterisierung einer DNS-Sequenz erfolgt durch Restriktionskartierung. Aufgrund der Komplexität des Eukaryonten-Genoms können einzelne DNS-Fragmente bei Gelelektrophorese nicht identifiziert werden, lediglich amplifizierte Sequenzen, wie Satelliten-DNS oder ribosomale RNS codierende DNS bildet bei Gelelektrophorese inmitten eines "Hintergrundschmiers" von DNS-Fragmenten sichtbare definierte Banden. Unikale oder mittelrepetive DNS-Sequenzen (z.B. Strukturgen-Sequenzen, Gene der Histone) können erst identifiziert werden, wenn eine Reaktion mit einer Verstärkungseffekt ausübenden, z.B. radioaktiv markierten Nukleinsäure erfolgt. Das Problem der Charakterisierung wird damit verschoben auf die Verfügbarkeit einer einheitlichen Nukleinsäure-Probe für die interessierende Gen-Sequenz.
Bei transkribierten DNS-Sequenzen bietet sich dafür die eine natürliche Vervielfältigungsstufe darstellende spezifische RNS an. Aber nur die innerhalb der RNS-Population einer Zelle überrepräsentierten Vertreter, etwa die rRNS-Arten oder die mRNS hochspezialisierter Zellen (Retikulozyten, Lymphozyten, Drüsenzellen des Hühnchen-Ovidukts), können einfach auf Grund physikalischer Größen gereinigt werden. Diese Gensequenzen wurden

deshalb als erste eukaryontischen Gene auf molekularer Ebene charakterisiert. Wenn die mRNS eines Gens nicht die dominierende Nukleinsäure einer Zelle ist, kann ihre Sequenz homogen vervielfältigt werden, wenn das zugehörige Protein gereinigt vorliegt. Über die Reaktion des dagegen gerichteten spezifischen Antiserums kann bei In vitro-Translation die mRNS identifiziert und angereichert werden. Wird die RNS mit Reverser Transkriptase in cDNS (copy-DNS) übersetzt und in einen Plasmid-Vektor kloniert, stellt sie eine gut verfügbare Nukleinsäure-Probe für Hybridisierungen dar.
Für Pflanzen-Gene wurden vor allem cDNS-Klone für Gene gebildet, deren Proteine einen großen Anteil der Zellproteine ausmachen (Speicherproteine, Wienand et al., 1981; Sun et al., 1981; Schuler et al., 1982; Forde et al., 1981; Pedersen et al., 1982; Croy et al., 1982; α-Amylase, Baulcombe, 1983; Lectine, Fischer et al., 1982; Leghaemoglobin, Hylding-Nielsen et al.,1982). Aber auch induzierbare Gene, deren mRNS nach Induktion einen hohen Anteil der Gesamt-RNS ausmacht, können durch einen Plus/Minus-Ansatz mit RNS-Proben gewonnen nach und ohne stimulierenden Impuls, auf cDNS-Ebene selektioniert werden. Auf diese Weise wurden cDNS-Klone der Hitzeschockgene bei Glycine (Schöffl et al., 1983), des Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein von Gerste (Gollmer et al., 1983) und des Alkoholdehydrogenase-Gens bei Mais (Gerlach et al., 1982) gewonnen. Auch die Chalkonsynthase-spezifische cDNS aus Petersilie enthaltenden Bakterienklone LF 12 und LF 56 wurden so gebildet (Kreuzaler et al., 1983). Ein analoges Verfahren ist bei Matthiola incana schwer durchzuführen, da nur intakte Pflanzen und Kalluskulturen zur Verfügung stehen. In beiden Systemen ist eine koordinierte Induktion aller Zellen schlecht möglich, so daß immer ein Gemisch von Zellen vorliegt, die auf unterschiedlichen Stufen der Transkriptionsaktivierung des Chalkonsynthase-Gens stehen.
Da aber das Enzym-Protein aus Matthiola incana mit dem gegen das aus Petersilie-Zellkulturen gebildeten Antiserum (Kreuzaler et al., 1979) kreuzreagiert (Rall, 1983), besteht die Möglichkeit, daß auch die Chalkonsynthase-Gen-Sequenz von Matthiola

mit den cDNS-Klonen pLF 12 und pLF 56 identifiziert werden kann.
Die Wahrscheinlichkeit, mit Restriktionskartierung die Art der Mutation im Chalkonsynthase-Gen des Stammes 18 zu fassen, ist gering; auch Aufschluß über Regulationsstrukturen ist, da die cDNS nur transkribierte Sequenzen, bevorzugt die des 3'-Endes, erkennt, nicht unbedingt möglich. Um dies zu erreichen, muß die gesamte genomische Chalkonsynthase-Gen-Sequenz isoliert und vermehrt und so molekularer Analyse zugänglich gemacht werden. Diese Art der Analyse von Mutationen nach Klonierung der DNS-Sequenzen wurde bereits für andere Pflanzen angewandt: Mutationen im Lectin-Gen von Glycine (Goldberg et al., 1983), im Sucrosesynthase-Gen von Mais (Burr und Burr, 1982; Fedoroff et al., 1983; Geiser et al., 1983; Döring et al., 1984), im Alkoholdehydrogenase-Gen von Mais (Strommer et al., 1982; Döring et al., 1984), im "waxy"-Locus von Mais (Shure et al., 1983; Schwarz-Sommer et al., 1984) und im Chalkonsynthase-Gen von Antirrhinum (Wienand et al., 1982; Saedler et al., 1982; Bonas et al., 1984) konnten durch Insertion einer DNS-Sequenz ins Strukturgen erklärt werden.
Eukaryontische Sequenzen können durch Ligation an Klonierungsvehikel - Plasmide, Abkömmlinge des Bakteriophagen λ oder Cosmide - in Bakterien vermehrt werden. Um aus den klonierten Sequenzen eine beliebige herauszufinden, muß, wie bei der Analyse durch Restriktionskartierung, ihre Identifizierung mit einer Nukleinsäure-Probe möglich sein.

Die verschiedenen Klonierungssysteme bieten unterschiedliche Vor- und Nachteile. Der Vorteil des Plasmid-Systems liegt in seiner guten Handhabbarkeit; nach der Klonierung kann die gewünschte Sequenz problemlos in großen Mengen gewonnen werden. Der Nachteil besteht in diesem System darin, daß die Untersuchung einer großen Zahl von Klonen Zeit- und Material-aufwendig ist, da die Insertionen relativ klein sind (maximal 10 kbp, z.B. Gerlach et al., 1979; Maniatis, 1982). Soll ohne vorherige Aussonderung von DNS-Sequenzen die gesamte genomische DNS eines Organismus kloniert werden, ist dieses System daher wenig geeignet. Plasmide werden nur bei Organismen mit geringer Genom-

größe benutzt, um vollständige "DNS-Bibliotheken" zu erstellen (E. coli, Clarke und Carbon, 1976; Drosophila, Wensink et al., 1974). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Klonierung von Organellen- und Virus-DNS (Leaver und Forde, 1980; Bogorad et al., 1980; Levinson et al., 1982). Wenn eine DNS-Sequenz aus der Gesamt-DNS aussortiert werden kann, etwa auf Grund ihrer Größe bei Restriktionsverdau oder durch ihre Schwebedichte, ist Klonierung im Plasmid-Vehikel möglich (z.B. Hemleben et al., 1982; Ganal, 1984).
Eine "DNS-Bibliothek" für Organismen mit großem Genom (mit mehr als 0,8 pg DNS pro haploidem Genom) wird effizienter im Phagen- oder Cosmid-System erstellt. In diesen beiden Systemen können große DNS-Fragmente (z.T. größer als 20 kbp) integriert und hohe Klonzahlen gut untersucht werden. Genomische Bibliotheken in Abkömmlingen des Bakteriophagen λ wurden zuerst von Blattner (1978) und Maniatis (1978) für Mensch und Maus bzw. Kaninchen erstellt.
In Vektorsystemen einrekombinierte DNS kann vermehrt und zu verschiedenen Untersuchungen eingesetzt werden: Sie kann als Sonde zum Auffinden ihrer natürlichen DNS-Umgebung benutzt werden; es können Protein-Bindungsstudien durchgeführt und so z.B. Promotor-Strukturen identifiziert oder Chromatin-Rekonstitution durchgeführt werden. Aus dem Vergleich der in Bakterien klonierten DNS mit der ursprünglichen DNS kann auf spezifische Methylierung geschlossen werden. DNS-Teilsequenzen können durch Kombination mit anderen DNS-Sequenzen oder durch In-vitro-Mutagenese auf ihre Funktion getestet werden.
Für das Chalkonsynthase-Gen von Matthiola incana ergäbe sich nach Isolierung der genomischen Gensequenz die Möglichkeit, die Art der Mutation im Stamm 18 "Nukleotid-genau" durch Sequenzierung aufzuklären. Außerdem bietet sich diese Mutante als Rezipient an, in dem die Aufnahme und Expression des intakten Chalkonsynthase-Gens über ein Vektorsystem (evtl. das Ti-Plasmid) direkt nachzuweisen wäre. Dies würde ein In vivo-Testsystem definieren, in dem auch Regulationsstrukturen, die dem Chalkonsynthase-Strukturgen vorgeschaltet würden, auf ihre Funktion überprüft werden könnten. Umgekehrt sind auch die Re-

gulationsstrukturen des Chalkonsynthase-Gens selbst, die, wenn sie kolinear zum Strukturgen vorhanden sind, mit dessen Sequenz als "Angel" auch gefunden werden müßten, nicht uninteressant, denn über sie verläuft vermutlich die entwicklungsspezifische Induktion des Chalkonsynthase-Gens von Matthiola incana.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die cDNS-Klone pLF 12 und pLF 56, die Chalkonsynthase-spezifische Sequenzen aus Petersilie enthalten, auf ihre Kreuzreaktion mit Matthiola-DNS zu testen, und, falls diese ausreicht, mit ihrer Hilfe die Restriktionskarte des mutierten Gens mit der Chalkonsynthase-Gensequenz der Wildtyp-Stämme zu vergleichen. Parallel sollten Systeme zur Klonierung dieses bestimmten Gens und zur Erstellung einer genomischen Bibliothek der Matthiola-DNS entwickelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial, Bakterien- und Phagenstämme

2.1.1. Pflanzenmaterial

2.1.1.1. Matthiola incana

Es wurden Keimlinge, Blüten, Blätter und Sprosse der Matthiola-Linien 06, 04, 17 und 18 benutzt. Die Genotypen dieser Stämme sind in Tab. 1 beschrieben; welchen Einfluß die Gene e, f, g und b, l, u, v auf die Synthese der Anthocyane haben, zeigt Abb. 2. Die Blütenstadien wurden wie von Kittel (1981) beschrieben bezeichnet.

Tabelle 1: Genotypen der verwendeten Matthiola incana-Linien.

Linie	Komplementäre Grundfaktoren für Färbung			Modifikatoren für Anthocyane				Farbe der Petalen
	f	e	g	b	l	u	v	
04	+	+	+	+	+	+	v	leuchtend lila
06	+	+	+	+	l	+	v	stumpf lila
17	+	e	+	+	+	+	+	weiß
18	f	+	+	+	+	+	+	weiß
18b	f	+	+	b	+	+	+	weiß

2.1.1.2. Antirrhinum majus

Es wurden Blätter, Blüten und Sprosse der Antirrhinum-Stämme 1 und 4 aufgearbeitet. Der Stamm 4 bildet Anthocyane, während der Stamm 1 (niv, niv) weiß-blühend ist; er besitzt keine CHS-Aktivität (Spribille und Forkmann, 1982). Die Genetik von Antirrhinum wurde von Stubbe (1941) beschrieben.

2.1.1.3. Anzucht der Pflanzen

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bzw. auf dem Versuchsfeld des Lehrstuhls für Genetik angezogen. Keimlinge wurden aus mit dem Fungizid "Orthocid" behandelten Samen unter sterilen Bedingungen gezogen.

2.1.2. Bakterienstämme

Zur Transformation wurde der Bakterienstamm E. coli K12 RRI benutzt (Boyer und Roulland Dussoix, 1969).

Die Plasmide pBR 322 und pBR 325 wurden aus mit diesen Plasmiden transformierten E. coli K12 HB101 Bakterien gewonnen (Bolivar et al., 1975; Bolivar, 1978; Boyer und Roulland Dussoix, 1969).

Die Plasmide pLF 12 und pLF 56 wurden aus den Bakterienklonen LF 12 und LF 56 isoliert (Kreuzaler et al., 1983).

Diese Stämme wurden von Prof. Dr. K. Hahlbrock und Dr. F. Kreuzaler zur Verfügung gestellt.

Als Indikatorstämme für die Anzucht von Phagen wurden benutzt:

E. coli K12 C600 (supE, tonA): λNM 762, λNM 1150 (Appelyard, 1954).

E. coli K12 NM430 (lacZ, amb, r_k^-, m_k^-): λNM 762 (Murray et al., 1977).

Dieser Stamm wurde von Dr. N. Murray zur Verfügung gestellt.

E. coli K12 NM514 (r_k^-, m_k^-): λ1150-Abkömmlinge (Murray et al., 1977, und pers. Mitteilung).

Dieser Stamm wurde von Dr. N. Murray zur Verfügung gestellt.

E. coli K12 NM538 (= ED 8654 ohne supE): λ EMBL 3A (Frischauf et al., 1983).

Dieser Stamm wurde von Dr. H. Jäckle zur Verfügung gestellt.

E. coli K12 BHB2600 (803 $supE^+$, $supF^+$, r_k^-, m_k^-, met): gtWES (Hohn, 1979).

Dieser Stamm wurde von Dr. U. Wienand zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung der Verpackungsmixe wurden benutzt:

E. coli K12 BHB2688 (N205, recA⁻ < imm434, cI_{ts}, b2, red3, Eam, Sam7>/λ)

E. coli K12 BHB2690 (N205, recA⁻ < imm434, cI_{ts}, b2, red3, Dam, Sam7>/λ) (Hohn, 1979).

Diese Stämme wurden von Dr. U. Wienand und Dr. E. Jacob zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Phagenstämme

Phage λNM 1150 (imm434, red⁻-Abkömmling von λNM 728) (Murray et al., 1977, pers. Mitteilung).

Phage λNM 762 (supF7) (Murray et al., 1977).

Diese Phagen wurden von Dr. N. Murray zur Verfügung gestellt.

Phage λgtWES (supF⁻, supE⁻) (Sternberg et al., 1977).

Dieser Phage wurde von Dr. U. Wienand zur Verfügung gestellt.

Phage λEMBL 3A (Aam, Bam) (Frischauf et al., 1983).

Dieser Phage wurde von Dr. H. Jäckle zur Verfügung gestellt.

2.2. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1. Isolierung von Pflanzen-DNS

2.2.1.1. Reinigung von Pflanzen-DNS über CsCl- und CsCl-Actinomycin D-Dichtegradienten

DNS wurde aus Zellkernen von Matthiola-Keimlingen, -Blüten oder -Blättern und aus Blüten oder jungen Sprossen von Antirrhinum majus nach Proteinase K-Verdau durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen; z.T. wurde die DNS zusätzlich über einen Actinomycin D-CsCl-Gradienten gereinigt. Die Präparation der Kerne und die Zentrifugation wurden wie von Leber und Hemleben (1979) beschrieben ausgeführt. Allerdings wurde dem Kernisolierungsmedium Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,2-0,5% zugesetzt.

Bei Präparation von DNS aus Keimlingen, Blättern und Sprossen

wurden die Kerne mit Kernisolierungsmedium mit 0,5% Triton X-100 gewaschen.

2.2.1.2. Reinigung über CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten

Zur weiteren Reinigung der Pflanzen-DNS kann an den CsCl-Dichtegradienten ein EtBr enthaltender CsCl-Gradient angeschlossen werden. Dazu wurden die DNS-enthaltenden Fraktionen des CsCl-Gradienten vereinigt, das Volumen auf 7 ml aufgefüllt (mit 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA), mit CsCl ein Brechungsindex von 1,3900 eingestellt und pro ml Lösung 0,08 ml EtBr (10 mg/ml) zugegeben. Zentrifugation erfolgte für 48 h bei 20°C und 32 000 rpm im Rotor Ti 50 (Beckman). Die DNS-Bande wurde mit einer Einmalspritze ohne Kanüle entnommen, EtBr durch mehrfaches Ausschütteln mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) entfernt und die DNS nach Dialyse (2 x 2 l TE, ÜN) mit 0,3 M NaAcetat und 2 Volumen Ethanol gefällt.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNS

Die Plasmide wurden amplifiziert und präpariert nach der Methode von Bazarel (1968) mit Modifikationen, die von Klipp (1978) beschrieben wurden.

2.2.2.1. Miniscreen zur schnellen Präparation von Plasmid-DNS

Als Methode zur schnellen Präparation von Plasmid-DNS in kleinen Mengen wurde das Verfahren von Birnboim und Doly (1979) benutzt. Abweichend von ihrem Schema wurden die gesamten erstmals gefällten Nukleinsäuren einer RNase-Behandlung unterzogen (30 min, 100 µg/ml, 37°C, 0,1 M NaAcetat, 0,05 M Tris pH 8,0). Danach wurde 3x mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) deproteinisiert und die Plasmid-DNS durch Schnellfällung (2 min, -20°C) gewonnen.

2.2.3. Isolierung von Phagen-DNS

2.2.3.1. Anzucht der Phagen

2.2.3.1.1. Anzucht von Indikatorbakterien ("100-fach Bakterien")

100 ml LMM-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN angezogen. Die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4°C) konzentriert und in 1 ml kalter steriler 10 mM $MgSO_4$-Lösung aufgenommen. Diese "100-fach Bakterien" können bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.1.2. Herstellung eines Ausgangslysats

Ein Phagen-Plaque wurde mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, mit 20 µl "100-fach Bakterien" 15 min bei 30°C präinkubiert. Dann wurden 5 ml NZY-Medium zugegeben. Bakterienlyse trat bei heftigem Schütteln der Lösung bei 37°C nach 5-8 h ein. Der Phagentiter betrug 10^9-10^{10} pfu/ml.

2.2.3.1.3. Anzucht von Phagen im großen Maßstab

Pro ml Kulturmedium (200-1000 ml) wurde 1 µl "100-fach Bakterien" eingesetzt; diese wurden mit 1 µl Phagenausgangslysat angeimpft und präinkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde zu dem warmen (37°C) Kulturmedium gegeben. Es wurde unter heftigem Schütteln bei 37°C angezogen. Nach Lyse der Bakterien (3-6 h nach dem Animpfen) wurde 1/100 Volumen Chloroform zugegeben und 15 min bei 8°C geschüttelt. Bakterientrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 4000 x g) entfernt.

2.2.3.2. Konzentrierung der Phagen

2.2.3.2.1. Zentrifugation

Das geklärte Phagenlysat wurde 3 h mit 12 000 rpm im GSA-Rotor

(Sorvall, 23 400 x g) abzentrifugiert, das Phagenpellet in Phagenpuffer aufgenommen und mit 20 µg/ml RNase 30 min bei 37°C inkubiert. Der Verlust an Phagen betrug bei dieser Methode 10-50%.

2.2.3.2.2. PEG-Vernetzung

Zum geklärten Lysat wurde DNase I und RNase gegeben (Endkonzentration je 10 µg/ml; DNase I, Reinheitsgrad II). Dann wurde pro 200 ml Lysat 4 g NaCl zugegeben und gelöst. Nach dem Auflösen des NaCls wurden pro 200 ml Lysat 16 g PEG 6000 zugegeben und aufgelöst. Die Phagen präzipitieren nach Lagerung bei 4°C ÜN. Sie wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, GSA-Rotor von Sorvall, 5800 x g, 4°C) konzentriert. Das Pellet wurde in Phagenpuffer gelöst. Die Verluste lagen bei dieser Methode bei maximal 30% der im Lysat vorhandenen Phagen.

2.2.3.3. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

2.2.3.3.1. Kontinuierliche CsCl-Gradienten

Zu den in Phagenpuffer gelösten Phagen (5 ml) wurde CsCl bis zu einer Dichte von 1,5 g/ml gegeben. Diese Lösung wurde im Rotor SW 65 (Beckman) bei 36 000 rpm, 20°C, 15 h zentrifugiert. Die Phagen bilden eine bläulich-weiße Bande in der Mitte des Gradienten. Sie wurden durch Abheben entnommen (Volumen weniger als 0,5 ml).

2.2.3.3.2. CsCl-Stufengradienten

In Röhrchen des Rotors SW 40 (Beckman) wurden folgende Volumina CsCl-Lösungen (in CsCl-Puffer) gegeben:

1,0 ml $ = 1,7 g/ml
1,5 ml $ = 1,5 g/ml
3,5 ml $ = 1,3 g/ml

Auf diese CsCl-Lösungen wurde die Phagensuspension (5 ml) ge-

schichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 35 000 rpm und 20°C eine Stunde. Die Phagenbande wurde entnommen; zu dieser Phagenlösung wurde so viel CsCl gegeben, daß ihre Dichte 1,5 g/ml überstieg. Sie wurde daraufhin in ein SW 40 Gradientenröhrchen gegeben und mit 3 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,5 g/ml und 1 ml Lösung der Dichte 1,3 g/ml überschichtet. Schließlich wurde das Röhrchen mit Phagenpuffer aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte wie zuvor.

2.2.3.4. Reinigung der Phagen-DNS

2.2.3.4.1. Aufschluß mit Proteinase K

Die in der CsCl-Lösung enthaltenen, über Gradienten gereinigten Phagen wurden gegen Dialyse-Puffer (1 x 100 ml, 1 x 2 l) dialysiert. Dann wurde die Phagensuspension (rund 1 ml) mit 1 ml Proteinase K-Lösung länger als 1 h bei 37°C abgebaut. Die Lösung wurde mit Phenol pH 8,0-Chloroform (1:1) deproteinisiert und mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) 2 x nachextrahiert. Danach wurde die DNS mit zwei Volumen Ethanol gefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen.

2.2.3.4.2. Aufschluß mit Formamid

Die Phagensuspension aus dem CsCl-Gradienten ($\leq$ 1 ml) wurde mit einem Volumen Formamid länger als eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein (laufendes) Volumen H_2O und 0,54 (laufende) Volumen Isopropanol zugegeben; es präzipitieren Nukleinsäuren und Protein, sie wurden durch Zentrifugation (10 min, 10 000 x g, 4°C) pelletiert und gut mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das kurz getrocknete Pellet wurde in 450 µl sterilem H_2O gelöst, 50 µl NaAcetat zugegeben und das Protein mit Phenol pH 8,0-Chloroform (1:1) entfernt. Nach 2-facher Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNS mit 2 Volumen Ethanol gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen.

2.2.3.5. Schnelle Phagen-DNS-Präparation

100 ml warmes NZY-Medium wurden mit 100 µl "100-fach Bakterien" und 100 µl präadsorbierten Phagen beimpft. Nach Lyse wurden die Phagen wie in 2.2.3.1.3. und 2.2.3.2.1. beschrieben weiterbehandelt. Die pelletierten Phagen wurden in 2 ml Phagenpuffer gelöst (≥ 1 h), die Suspension durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, Minifuge, 4000 x g) geklärt und 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml DNase I und 20 µg/ml RNase inkubiert. Daraufhin wurde 1 ml Proteinase K-Lösung zugegeben und (≥ 1 h) bei 37°C inkubiert. Die DNS-Lösung wurde mit Phenol pH 8,0-Chloroform (1:1) ausgeschüttelt und 2 x mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) nachextrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2 Volumen kaltem Ethanol versetzt, sofort abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C, 4000 x g), das Pellet kurz getrocknet und in 500 µl Tris-EDTA gelöst. Es wurde wiederum mit 2 Volumen Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE gelöst. Ein Aliquot (1/5 bis Gesamtmenge) wurde mit Restriktionsenzymen abgebaut.

2.2.4. Isolierung von RNS aus Matthiola-Blüten

2.2.4.1. Aufarbeitung der Blüten

5 g Blütenpetalen (Stamm 04, Stadium I und II) wurden in 20 ml Tris-$MgCl_2$-Puffer im Mörser kurz homogenisiert und im Ultraturrax aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 2 x mit Kirby-Mix/Chloroform (1:1) und 2 x mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die Phenolphasen wurden mit Puffer nachextrahiert. Die Nukleinsäuren wurden mit 3 Volumen Ethanol 30 min bei -70°C gefällt. Sie wurden pelletiert, einmal gewaschen, in 3 ml Tris/$MgCl_2$/SDS (50 mM pH 7,6/2 mM/0,1%) gelöst und wie zuvor gefällt. Die umgefällten Nukleinsäuren wurden in Tris/$MgCl_2$ (50 mM pH 7,6/ 5 mM) aufgenommen und mit 2 mg/ml DNase I (Reinheitsgrad I) 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNase I wurde mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) entfernt und die RNS gefällt.

2.2.4.2. Saccharosegradientenzentrifugation der RNS

Je 250 µg RNS wurden auf einem Saccharosegradienten in Größenklassen aufgetrennt. Der Gradient umfaßte Saccharose-Konzentrationen von 0,3 bis 1,7 M. Er wurde aus je 1 ml der Lösungen 1-11 geschichtet (die Lösungen wurden in 10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl hergestellt):

Lösung 1 = 0,3 M Saccharose,
Lösung n = 6 ml Lösung (n-1) + 3 ml Lösung 11, n=2-10,
Lösung 11 = 1,7 M Saccharose.

Die Zentrifugation erfolgte über 17 h bei 33 000 rpm im Rotor SW 40 (Beckman) bei 5°C.
Niedermolekulare RNS (4S und kleiner) enthaltende Fraktionen wurden von den weiteren Reaktionen ausgeschlossen.

2.2.4.3. Isolierung von Poly(A)$^+$-RNS über Poly(U)-Sepharose

Die Auftrennung erfolgte nach einer Methode von Lindberg und Persson (1972).
Gequollene, äquilibrierte Poly(U)-Sepharose wurde in eine Pasteurpipette gefüllt (Volumen ca. 2 ml). Die 3 min auf 65°C in Bindepuffer erhitzte RNS (900 µg) wurde bei 20°C aufgetragen. Das Eluat wurde noch zweimal über die Säule gegeben, um eine vollständige Adsorption der Poly(A)$^+$-RNS zu erreichen. Die nicht-polyadenylierte RNS wurde mit ca. 15 ml Bindepuffer eluiert (10 x 1,5 ml), die Säule mit 50 ml Bindepuffer nachgewaschen und dann auf 37°C erwärmter Elutionspuffer zugegeben. Die Elution der Poly(A)$^+$-RNS erfolgte bei 37°C. Die Poly(A)$^+$-RNS enthaltenden Fraktionen wurden mit 0,5 M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt und vor ihrem Einsatz zur Kinasereaktion wie die aus Saccharosegradienten gewonnene RNS behandelt (2.5.1.2.).

2.3. Vorbereitung von DNS zur Klonierung und Hybridisierung

2.3.1. Restriktionsabbau von DNS

Es wurden die vom Hersteller vorgeschriebenen Enzympuffer und Inkubationstemperaturen benutzt. Die maximale DNS-Konzentration betrug 200 µg/ml, das Restriktionsenzym-Volumen betrug nie mehr als 1/10 des Restriktionsansatzes. Nach dem Abbau wurden die Restriktionsendonukleasen bei 70°C inaktiviert und z.T. mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Wurde die DNS zur Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt, wurde 1/10 bis 1/5 Volumen Stopp-Mix zugesetzt.

2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Transfer

Mit Restriktionsenzymen verdaute DNS wurde auf 0,5%igen Gelen (Phagen-DNS) oder 0,7%igen Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50-100 mA (≙ 30-60 V).
Der Transfer der DNS auf Nitrozellulose erfolgte nach der Methode von Southern (1975).

2.3.3. Fixierung von DNS auf Rundfiltern

DNS wurde in 2 x SSC gelöst oder DNS-Lösungen aus Saccharosegradienten direkt eingesetzt. Zur Denaturierung wurde 1 Volumen 1 N NaOH zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein vierfaches Volumen (bezogen auf das Volumen der NaOH) eiskaltes Neutralisierungsmedium zugegeben, gemischt und die Lösung sofort auf mit 2 x SSC benetzte Nitrozellulosefilter (ø 13 mm) gegeben. Die luftgetrockneten Filter wurden zur Fixierung der DNS 2 h bei 80°C unter Vakuum gelagert.

2.3.4. Partieller Abbau von Matthiola-DNS mit Restriktionsenzymen

Unvollständiger Abbau von Matthiola-DNS wurde wie von Maniatis

(1982) beschrieben durch Herabsetzen der Enzym-Menge erreicht. Bei einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C wurde die DNS mit Hind III abgebaut, 1 h Inkubation bei 0°C reichten bei Abbau mit Sau 3A aus, um die Hauptmenge der DNS in Fragmente der Größe 10-20 kbp zu schneiden.

2.3.5. Abbau von Phagen-DNS mit Restriktionsenzymen

Phagen-DNS wurde mit 3 u/µg des zur Klonierung benutzten Restriktionsenzyms 30 min bei 37°C abgebaut, dann wurde zusätzlich 1 u/µg Enzym zugegeben und mindestens eine weitere Stunde inkubiert.

2.3.5.1. Schnelle Isopropanolfällung zur biochemischen Selektion beim Phagen λ EMBL 3A

Dieses Verfahren wurde von Frischauf et al. (1983) und Lehrach und Frischauf (1982) beschrieben.
Vektor-DNS wurde wie oben angegeben mit Bam HI abgebaut. Anschließend wurde EDTA bis zu einer Endkonzentration von 15 mM zugegeben und 10 min auf 68°C erhitzt und die DNS mit Ethanol gefällt. Das DNS-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst und mit 3 u/µg Eco RI abgebaut (60 min, 37°C). Die EDTA-Konzentration wurde wiederum auf 15 mM gebracht und die Enzyme mit Phenol pH 8,0-Chloroform (1:1) entfernt und 2 x mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) nachextrahiert. Zur wässrigen Phase wurden 0,15 (laufende) Volumen 3 M NaAcetat pH 6,0 und 0,6 (laufende) Volumen Isopropanol zugegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die großen DNS-Fragmente durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde 2 x mit 0,45 M NaAcetat pH 6,0/Isopropanol (1:0,6) und 1 x mit 0,3 M NaAcetat/Ethanol (1:2,5) gewaschen.

2.3.5.2. Ligation der Phagen-Arm-Fragmente zur Zentrifugation auf Saccharosegradienten

Gute Ligationsergebnisse wurden mit folgender Methode erzielt:

Die mit Restriktionsenzym abgebaute, mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelte präzipitierte DNS wurde in Tris pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA aufgenommen und auf 60°C erhitzt. Über 2 h hinweg wurde die Temperatur auf 40°C abgesenkt. Die DNS wurde bis zur Zentrifugation auf Eis gestellt.

2.3.6. Saccharosegradientenzentrifugation

2.3.6.1. Saccharosegradientenzentrifugation zur Isolation der cDNS-Sequenz aus pLF 12 und pLF 56

Je 100 µg mit Pst I abgebauten Plasmids wurden auf lineare Saccharosegradienten gegeben. Die beste Auftrennung wurde erreicht, wenn diese Gradienten mit einem Volumen von 9 ml Saccharose-Konzentrationen von 10-30% (w/w) überstrichen. Zentrifugiert wurde im Rotor SW 40 (Beckman) 8 h mit 39 000 rpm bei 5°C. Als Gradientenpuffer wurde eine Lösung aus 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl und 5 mM EDTA benutzt. Nach dem Lauf wurden Fraktionen zu je 6 Tropfen ausgetropft, die Insert-DNS enthaltenden Fraktionen vereinigt und gegen 2 x 2 l TE dialysiert. Die Insert-DNS wurde durch Fällung mit 0,3 M NaAcetat und 2 Volumen Ethanol konzentriert.

2.3.6.2. Saccharosegradienten zur Auftrennung vollständig abgebauter Matthiola-DNS

Die Gradienten umfaßten bei 5,5 ml Volumen Saccharose-Konzentrationen von 5-30% (w/w) im oben beschriebenen Puffer (2.3.6.1.). Es wurde 6 h im Rotor SW 40 (Beckman) mit 39 000 rpm bei 5°C zentrifugiert. Die in einem Aliquot der einzelnen Fraktionen (75-150 µl) enthaltene DNS wurde wie unter 2.3.3. beschrieben auf Nitrozellulose fixiert.

2.3.6.3. Saccharosegradienten zur Abtrennung des Phagen-DNS-Mittelfragments von den Phagen-Armen (λgtWES, λNM 762)

Die beste Auftrennung wurde bei folgender Methode erhalten: Die linearen Saccharosegradienten überstrichen Saccharose-Konzentrationen von 10-40% (w/w) in 1 M NaCl, 20 mM Tris pH 8,0 und 10 mM EDTA. Pro Dichtestufe (Differenz je 2,5%) wurden 0,85 ml einpipettiert. Der Lauf erfolgte im Rotor SW 40 (Beckman) bei 5°C mit 26 000 rpm über 25 h. Nach dem Lauf wurde wie unter 2.3.6.1. vorgegangen. Die nach der Dialyse erhaltene DNS-Lösung wurde mit 2-Butanol 3-4fach konzentriert und mit 0,3 M NaAcetat und 2 Volumen Ethanol gefällt.
Parallel zu den Phagen-DNS-Fragmenten wurden die verschiedenen Größenklassen unvollständig abgebauter Matthiola-DNS aufgetrennt.

2.3.7. Elution von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNS-Fragmenten aus Gelen wurden die sie enthaltenden Agarosestücke ausgeschnitten und mit minimalstem Volumen 1/20 verdünntem Borat-Puffer in einen Dialyseschlauch überführt und der Dialyseschlauch so geschlossen, daß keine Luftblasen zurückblieben. Der Dialyseschlauch wurde senkrecht zum Spannungsfeld in ein Horizontal-Elektrophorese-Gefäß gelegt und mit 1/20 verdünntem Borat-Puffer bedeckt. Durch Elektrophorese über 3 h bei einer Spannung von 300 V wurde die DNS aus der Agarose gelöst. Danach wurde umgepolt und nochmals für 10 min eine Spannung von 300 V angelegt. Anschließend wurde die DNS-Lösung im Dialyseschlauch mit einer Spritze entnommen, mit Puffer nachgespült und in der Lösung enthaltene Agarose pelletiert (15 min, Eppendorf-Zentrifuge). Der wässrige Überstand wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat versetzt und mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Das gewaschene und getrocknete DNS-Pellet wurde zur Nicktranslation eingesetzt.

2.4. Klonierung

2.4.1. Klonierung im Plasmid-System

2.4.1.1. Ligation

Die zur Ligation eingesetzte Matthiola-DNS wurde ÜN mit 3 u Hind III-Endonuklease pro µg DNS abgebaut. Die Plasmid-DNS wurde parallel dazu mit 2 u/µg DNS abgebaut. Der Abbau war, soweit auf Agarosegelen sichtbar, vollständig. Das mit Hind III linearisierte Plasmid wurde 2 h mit 3 u/µg DNS alkalischer Phosphatase bei 65°C in 10 mM Tris pH 8,0 inkubiert.
Die Ligation wurde bei Matthiola-Gesamt-DNS in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt, für 7 µg DNS wurde 0,1 u Ligase eingesetzt. Bei Pflanzen-DNS aus Saccharosegradienten-Fraktionen wurden bei Gesamt-DNS-Mengen von ca. 2-7 µg 0,2 u Ligase benutzt. Ausgeführt wurde die Ligation durch Inkubation in einem Thermosgefäß über 12-18 h. Die Anfangstemperatur lag bei 21°C, die Endtemperatur bei 6-10°C.
Nach DNS-Abbau, alkalischer Phosphatase-Behandlung und Ligation wurden vorhandene Proteine mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und die DNS mit 0,3 M NaAcetat und 2 Volumen Ethanol gefällt.

2.4.1.2. Transformation

Zur Transformation wurde der Bakterienstamm E. coli K12 RRI benutzt. Die Transformation wurde ausgeführt nach der Anleitung von Cohen (1972) mit folgender Abwandlung: 2 x 50 ml Bakterien wurden bis zu einem Titer von 1-3 x 10^8 angezogen und in einem Endvolumen von 2 ml 30 mM $CaCl_2$ aufgenommen (vgl. Frey, 1980).

2.4.1.3. Koloniehybridisierung

Bei Transformationen mit Plasmiden aus pBR 325 und Matthiola-Gesamt-DNS wurden so wenige Bakterienklone erhalten, daß jeder

auf seine Antibiotikaresistenzen getestet und, wenn keine Tetracyclin-Resistenz vorhanden war, auf eine Mikrotiterplatte übertragen wurde.
In den anderen Fällen wurde ein Aliquot der transformierten Bakterien plattiert und der Titer rekombinante Plasmide enthaltender Bakterien abgeschätzt. Die restlichen Bakterien wurden so verdünnt, daß 0,1 ml durchschnittlich 10 Bakterien mit unabhängig entstandenen rekombinanten Plasmiden enthielten; sie wurden mit Ampicillin versetzt (100 µg/ml) und in Mikrotiterplatten (0,1 ml pro Mikrotiterstelle) ÜN angezogen. Als Kontrollen wurden die Bakterienstämme E. coli RRI und LF 56 mitangeimpft.
Die Bakterien wurden mit einem abgeflammten Stempel von der Mikrotiterplatte auf Nitrozellulose übertragen. Die DNS wurde nach der Methode von Grunstein (1975) auf der Nitrozellulose fixiert. Die Hybridisierung erfolgte wie in 2.5.2.1. beschrieben (Hybridisierungsbedingungen Ia).

2.4.2. Klonierung im Phagensystem

2.4.2.1. Herstellung der Verpackungsextrakte

Die Verpackungsextrakte wurden wie von Hohn (1979) beschrieben hergestellt.
Es wurde pro 500 ml NZY-Medium eine Agarplatte mit Bakterien (BHB 2688 oder BHB 2690) ausgestrichen. Diese Platte wurde bei 30°C 24 h inkubiert. Jede ausgestrichene Bakterienkolonie wurde parallel auf einer zweiten Platte bei 40°C gehalten. Nur wenn auf dieser Platte kein Bakterienwachstum erfolgte, wurden die bei 30°C gewachsenen Bakterien weiterverwendet.
Für die Aufarbeitung wurden 3 x 500 ml NZY-Medium mit den Bakterien BHB 2688 und 500 ml Medium mit Bakterien BHB 2690 angeimpft. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf 500 ml Ausgangskultur.
Bei einer Bakteriendichte von 2-3 x 10^8 wurden die lysogenen Phagen durch Temperaturerhöhung induziert; dazu wurden die Kolben mit der Bakteriensuspension in einem 70°C-Wasserbad heftig

geschüttelt, bis die Temperatur im Medium 45°C erreicht hatte (ca. 2-3 min). Anschließend wurde 30 min bei 45 °C inkubiert. Die induzierten Bakterien wurden 2-4 h bei 37°C bei guter Belüftung weitergezogen.
Durch Zusatz von Chloroform wurde in einem Aliquot der Bakterien der Erfolg der Induktion geprüft. Die Bakterien wurden in Eiswasser abgekühlt (10 min) und durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 4000 rpm, 2600 x g, GSA-Rotor, Sorvall). Das Pellet wurde in 10 ml LMM-Medium aufgenommen und 10 min mit 10 000 rpm, 4°C im SS 34-Rotor (Sorvall) abzentrifugiert. Daraufhin wurde die Flüssigkeit sorgfältig entfernt. Bis hierher laufen die Aufarbeitung von SE-Extrakt (Bakterien BHB 2690) und FTL-Extrakt (Bakterien BHB 2688) parallel.

FTL-Extrakt
Das Bakterien-Pellet wurde in 1,5 ml kalter 10%iger Saccharose-Lösung in 50 mM Tris pH 7,5 suspendiert. Es wurden 25 µl kalte Lysozym-Lösung (2 mg/ml, 0,25 M Tris pH 7,5) zugegeben, vorsichtig und gut gemischt.Diese Suspension wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und kann so bei -70°C gelagert werden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension langsam aufgetaut (1-2 h bei 4°C), auf Eis gestellt, 25µl M1-Puffer zugegeben und vorsichtig aber gut gemischt. Um die Ausbeute an Lysat zu steigern, bewährte es sich, diese Suspension gut gekühlt 10 x 2 sec mit Pausen von jeweils 15 sec mit Ultraschall (Branson Sonifier, Stufe 4) zu behandeln. Das Verpackungslysat wurde durch Zentrifugation (1 h, 20 000 rpm, 47 800 x g, 4°C, Rotor SS 34) von den Bakterientrümmern gereinigt, mit flüssigem Stickstoff in Portionen eingefroren und bei -70°C gelagert.

SE-Extrakt
Das Bakterien-Pellet wurde in 4,6 ml Puffer A aufgenommen. Die Bakterien wurden gut gekühlt mit Ultraschall (20 x 3 sec, Ruhepausen von 5 sec, Branson Sonifier, Stufe 4) aufgeschlossen. Die Suspension darf dabei nicht schäumen und nach der Behandlung nicht mehr viskös sein. Es wurde 6 min bei 10 000 rpm (11 900 x g) und 4°C im Rotor SS 34 abzentrifugiert, der Überstand mit flüssigem Stickstoff in Aliquots eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.4.2.2. Ligation

Die besten Ligationsergebnisse wurden mit folgenden Bedingungen erreicht: Die DNS-Konzentration im Ansatz betrug mindestens 100 µg/ml. Zu der DNS wurde 1/10 des Endvolumens 10 x Ligase-Grund-Puffer gegeben und bei 37°C 15 min inkubiert. Danach wurde die Lösung auf Eis gestellt und je 1/10 des Endvolumens 10 mM ATP und 100 mM DTT zugegeben. Ligase wurde bis zu einer Konzentration von 100 u/ml zugegeben, gut gemischt und 2 min bei 37°C erwärmt. Anschließend wurde die Reaktionslösung 45 min bei Raumtemperatur gehalten, dann wurde mindestens 12 h bei 12-15°C inkubiert. Der Erfolg der Ligation wurde nach Erhitzen (10 min, 70°C) auf Agarosegelen überprüft.
Der Ligationsansatz kann direkt zur Verpackung eingesetzt werden.

2.4.2.3. Verpackung in vitro ligierter DNS

In gekühlte Eppendorf-Gefäße wurde auf Eis einpipettiert: 7 µl Puffer A, 1-5 µl DNS-Lösung und 1 µl Puffer M1. An die Gefäßwand wurde pipettiert: 2 µl SE-Extrakt; dieser Extrakt wurde gemeinsam mit 8 µl FTL-Extrakt mit dem Puffer-DNS-Gemisch gründlich gemischt. Es wurde 10 min auf Eis inkubiert, nochmals kräftig gemischt und der Ansatz 15 min bei 30°C und 45 min bei Raumtemperatur gehalten.
Damit ist die Verpackung abgeschlossen. Die entstandenen Phagen können sofort plattiert werden (maximal 12 µl pro 20 µl "100-fach Bakterien" und Platte) oder Tage bei 4°C gelagert werden. SE- und FTL-Extrakte wurden kurz vor Gebrauch aufgetaut und stets auf Eis gehalten. Reste können mit flüssigem Stickstoff wieder eingefroren werden.

2.4.2.4. Screening der gebildeten Phagen

Die bei der Verpackung erhaltenen Phagen wurden mit Top-Agarose (5 ml pro Platte) ausplattiert. Für Hybridisierung optimale Konzentrationen liegen bei 5000 bis 20 000 Plaques pro Platte.

Nach 8-12stündigem Wachstum wurden die Agarplatten mindestens 30 min bei 10-4°C abgekühlt. Die Übertragung der Phagen auf Nitrozellulose und die Fixierung der DNS erfolgte wie von Benton und Davis (1977) beschrieben. Zur Adsorption, zum Trocknen, zur Denaturierung, Neutralisierung und Äquilibrierung wurden die Nitrozellulosefilter (Ø 82 mm) auf mit dem jeweiligen Medium getränktes 3MM-Papier gelegt; dabei lag die Filterseite, die mit den Phagen in Kontakt gekommen war, stets oben.
Die Lage des Filters auf der Agarplatte wurde durch Drei-Punkte-Markierung mit einer Nadel auf Nitrozellulose und Agarplatte festgelegt. Hybridisierungssignal-gebende Phagen oder Phagenregionen wurden mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und in 500 µl 10 mM $MgSO_4$ übertragen. Nach 15 min Diffusion wurden die enthaltenen Bakterien mit einem Tropfen Chloroform abgetötet. Diese Phagenlösung kann direkt zur Lyse von Bakterien in Flüssigkultur (20 µl "100-fach Bakterien" mit 20 µl Phagen in $MgSO_4$) oder zur Herstellung von Agarplatten (20 µl "100-fach Bakterien" mit 1-5 µl Phagen in $MgSO_4$) benutzt werden.

2.5. Hybridisierung

2.5.1. Herstellung radioaktiv markierter Proben

2.5.1.1. Nicktranslation zur Markierung von DNS

Die Nicktranslation erfolgte nach der Methode von Maniatis (1975). Es wurden pro µg DNS 60-100 µCi α-^{32}P-dCTP (2000-3000 Ci/mmol) und 10-16 u DNS-Polymerase I eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 15°C; sie wurde bei pLF 12/pLF 56-Insert-DNS nach 2,5 h, bei pBR 322-DNS nach 3 h durch Zugabe von EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 85 mM) beendet. Freie Triphosphate wurden durch eine mit Sephadex-G 50 in TE-Puffer gefüllte Pasteurpipette abgetrennt.

2.5.1.2. Kinasereaktion zur Endmarkierung von RNS mit γ-^{32}P-ATP

2.5.1.2.1. Alkalische Hydrolyse der RNS

Vor der Kinasereaktion wurde die RNS einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Die RNS wurde in 50 mM Tris pH 9,5 4 min auf 90°C erhitzt. Daraufhin wurde sie auf Eis abgekühlt und sofort Tris pH 7,5 bis zu einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben und mit 3 Volumen Ethanol gefällt. Die RNS wurde pelletiert, gewaschen und so gelöst, daß eine RNS-Konzentration von 1 µg/µl in sterilem H_2O erhalten wurde.

2.5.1.2.2. Endmarkierung mit T_4-Polynukleotidkinase

Die Kinasereaktion wurde im wesentlichen ausgeführt wie von Simek et al. (1973) beschrieben. Modifikationen wurden der Anleitung von Gerstner (1983) folgend eingeführt.
5 µl (= 5 µg) RNS wurden mit 1,2 µl 1 M Tris pH 8,0 und 3 µl H_2O 2 min bei 90°C inkubiert, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen. 2,5 µl (= 10 u) alkalische Phosphatase wurden auf Eis zugegeben und die Reaktion bei 37°C für 30 min durchgeführt. 0,8 µl NTA (100 mM, pH 7,2) wurden zur Entfernung der Zinkionen zugegeben, so daß die Inkubation bei 50°C (30 min) und 90°C (2 min) zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase genügt. Durch Zugabe von je 3,6 µl $MgCl_2$/Spermidin (0,2 M/32 mM), 500 mM Tris pH 7,5 und 0,3 M 2-Mercaptoethanol wurden für die T_4-Polynukleotidkinase optimale Pufferbedingungen hergestellt. Der Reaktionsansatz wurde zu 50-100 µCi γ-^{32}P-ATP gegeben und die Reaktion mit 10 u Enzym ausgeführt. Nach 12 min Inkubation bei 32°C wurden 1,2 µl 5 mM ATP zugegeben und die Inkubationstemperatur über 20 min auf 40°C gesteigert.
Freie Nukleotide wurden wie bei der Nicktranslation entfernt (2.5.1.1.).
Nach Nicktranslation und Kinasereaktion wurde jeweils ein Aliquot der markierten Nukleinsäuren mit 15% TCA (Endkonzentration) und 100 µg BSA auf Nitrozellulose gefällt, die Filter in 2 ml Quickszint gegeben und so die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

2.5.2. Hybridisierungsbedingungen

2.5.2.1. Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNS

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNS umfaßt die Vorhybridisierung (Dauer minimal 3 h), die Hybridisierung (Dauer mindestens 20 h) und die Waschvorgänge (3 x 1 h und 1 x 30 min). Die radioaktive Probe wurde durch dreiminütiges Aufkochen denaturiert und ins heiße Hybridisierungsmedium pipettiert. Die Nitrozellulosefilter wurden vor der Vorhybridisierung 30 min in 2 x SSC eingeweicht.

Hybridisierungsbedingungen I
Vorhybridisierungs- und Hybridisierungsmedium: 50% Formamid, 5 x SSC, 0,01% SDS, 1 mM EDTA, 0,02 M Hepes, 5 x Denhardt's Lösung (Denhardt, 1966). Inkubation je bei 37°C.
Waschbedingungen: 3 x 1 h: 5 x SSC, 0,5% SDS, 70°C;
1 x 30 min: 0,5 x SSC, 0,05% SDS, 60°C.

Hybridisierungsbedingungen Ia
Vorhybridisierungs- und Hybridisierungsmedium: wie in Bedingungen I, jedoch ohne Formamid. Inkubation je bei 60°C.
Waschbedingungen: Waschlösungen wie in Bedingungen I, Waschtemperaturen 60°C und 50°C.

Hybridisierungsbedingungen II
Vorhybridisierungsmedium: 6 x SSPE, je 0,02% Ficoll und Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,1% SDS, 100 µg hitzedenaturierte niedermolekulare DNS. Inkubation bei 60°C.
Hybridisierungsmedium: 3 x SSPE, je 0,02% Ficoll und Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,1% SDS, 100 µg/ml hitzedenaturierte niedermolekulare DNS, 10% Dextransulfat (w/v).
Zum Teil wurde dem Hybridisierungsmedium 10 µg/ml Poly-dC zugegeben und zur radioaktiven Probe 1/4 Volumen Formamid vor der Hitzedenaturierung gegeben. Diese Menge an Formamid verändert die Hybridisierungsbedingungen nicht (Endkonzentration 0,25%).
Inkubationstemperatur, falls nicht anders erwähnt: 60°C.
Waschbedingungen: 3 x 1 h: 2 x SSPE, 1% SDS, 5 µg/ml DNS, 60°C;
1 x 30 min: 0,2 x SSPE, 0,1% SDS, 0,5 µg/ml DNS, bei diesem Waschgang wurde die Temperatur stetig von 60°C auf 50°C gesenkt.

Hybridisierungsbedingungen IIa
Gegenüber den Bedingungen II ist lediglich das Hybridisierungsmedium verändert: es enthält kein Dextransulfat.

Hybridisierungsbedingungen III
Vorhybridisierung: wie bei Bedingungen II.
Hybridisierung: Dem Hybridisierungsmedium aus Bedingungen II wird 5,3% Formamid zugesetzt und bei 55°C inkubiert.
Die Waschvorgänge wurden wie in den Bedingungen II durchgeführt.

2.5.2.2. Hybridisierung mit ^{32}P-markierter RNS

Die Nitrozellulosefilter wurden in 2 x SSC eingeweicht. Hybridisiert wurde in 3 x SSC, 10% Formamid, 0,1% SDS bei 60°C. Bei Hybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNS wurde dem Medium 50 µg/ml 18S- und 25S-rRNS aus Phaseolus als Kompetitor zugesetzt.
Die Waschlösung bestand aus 3 x SSC (3 x 30 min). Nach diesem Waschvorgang wurde eine 30minütige RNase-Behandlung (20 µg/ml) angeschlossen und mit 2 x SSC und 0,1% SDS 2 x 15 min bei Raumtemperatur gewaschen.
Nach Hybridisierung wurden die Nitrozellulosefilter auf Whatman 3MM-Papier geklebt und ihre Lage mit ^{32}P-enthaltender Bromphenolblau-Lösung markiert. Diese Markierung ist besonders wichtig bei Hybridisierung von auf Nitrozellulose übertragenen Phagen, damit die Zuordnung von Hybridisierungsantwort und Phagenregion möglich ist.
Exponiert wurde bei -70°C mit Kodak X-omat S Röntgenfilm und Verstärkerfolie (DuPont).
Zur Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät wurden Rundfilter in 2 ml Quickszint gemessen.

2.5.2.3. Entfernen von ^{32}P-markierter RNS von Nitrozellulosefiltern

Die hybridisierten Nitrozellulosefilter wurden 20 min in 0,5 M NaOH geschüttelt, 2 x 2 min mit 1 M Tris pH 7,4 gewaschen und 5-20 min in 1 M Tris pH 7,4, 1,5 M NaCl neutralisiert. Die

Filter wurden in 2 x SSC gegeben und ein weiteres Mal zur Hybridisierung eingesetzt.

2.6. Aufnahme von Schmelzkurven

Rundfilter (Ø 13 mm) mit fixierter DNS wurden unter Hybridisierungsbedingungen II mit nicktranslatierter DNS hybridisiert. Die gebundene Radioaktivität wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät bestimmt. Danach wurden die getrockneten, mit Chloroform gewaschenen Filter in 1 x SSC überführt (je 1,2 ml) und zunächst 10 min bei 55°C inkubiert. Die Filter wurden daraufhin nach jeweils 10 min in um 5°C wärmere 1 x SSC-Lösung (1,2 ml) gelegt. Abschließend wurde 10 min bei 100-102°C aufgekocht. Je Temperaturstufe wurde 1 ml Überstand entnommen, gut mit 7 ml Unisolve 100 gemischt und die freigesetzte Radioaktivität bestimmt. Die Rundfilter wurden getrocknet und die verbliebene Radioaktivität durch Messung in 2 ml Quickszint bestimmt.
Der jeweils bei einem Temperaturwert abgeschmolzene Anteil Radioaktivität wurde als Prozentsatz der Gesamtradioaktivität angegeben.

2.7. Puffer und Lösungen

Tris-EDTA

100 mM Tris
5 mM EDTA pH 7,5 wurde mit HCl eingestellt

TE-Puffer

Tris-EDTA, 1:10 verdünnt

TE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris
1 mM EDTA pH 8,0 wurde mit HCl eingestellt

Phenol pH 8,0

kristallines Phenol wurde mit 1/2 Volumen 1 M Tris-HCl pH 8,0 gelöst, die Phenolphase wurde 2-3 x mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0 nachextrahiert

Kirby-Mix

22 Teile Phenol (wassergesättigt)
3 Teile m-Kresol mit 0,1% 8-Hydroxychinolin (Oxin)

3 M NaAcetat pH 5,2/pH 6,0

der pH-Wert der Lösung wird mit Eisessig eingestellt; wurde NaAcetat ohne pH-Angabe verwendet, handelte es sich um NaAcetat mit pH 5,2

TES-Puffer

5 mM EDTA
50 mM Tris
50 mM NaCl pH 8,0 wurde mit HCl eingestellt

Elektrophoresepuffer:

Agarosegelpuffer, 10fach konzentriert

360 mM Tris
300 mM NaH_2PO_4
20 mM EDTA pH 7,6 wurde mit HCl eingestellt

Borat-Elektrophorese-Puffer

10,8 g Tris-Base
5,5 g Borsäure
0,93 g EDTA pro 1

Stopp-Mix mit Ficoll

25% Ficoll
5% SDS
0,025% Bromphenolblau
es wird mindestens 1/6 Volumen zu der Probe gegeben

Dieser Puffer wurde beim Auftrag von Gesamt-DNS-Proben benutzt.

Stopp-Mix mit Glycerin

50% Glycerin
5% SDS
0,025% Bromphenolblau
es wird mindestens 1/10 Volumen zu der Probe gegeben

Puffer zur Isolierung von RNS:

Tris-$MgCl_2$-Puffer

50 mM Tris
2 mM $MgCl_2$ pH 7,5 wurde mit HCl eingestellt

Tris-$MgCl_2$-Puffer zum Aufschluß von Pflanzen

Tris-$MgCl_2$-Puffer mit 5% Phenol und 1% SDS

Elutionspuffer

TE-Puffer mit 0,2% SDS

Bindungspuffer

TE-Puffer mit 500 mM NaCl und 0,5% SDS

Puffer zur Isolierung von DNS:

Kernisolierungsmedium

400 mM Saccharose
50 mM Tris
10 mM $MgCl_2$
10 mM $NaCl^2$ pH 7,8 wurde mit HCl eingestellt

Proteinase K-Lösung

10 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA pH 8,0
1 mM NaCl
0,5% SDS
100 µg/ml Proteinase K

Medien und Puffer für die Anzucht von Bakterien und Phagen:

TIC-Medium

10 g Tryptone
1 g Yeast-Extrakt
5 g NaCl
1 g Glucose pro 1
für Agarplatten wurden 20 g Agar pro 1 zugegeben
Antibiotika-Zusätze: Tetracyclin: 20 mg/l
Ampicillin: 30 mg/l

L-Medium

10 g Tryptone
5 g Yeast-Extrakt
10 g NaCl
2,4g $MgSO_4$ pro 1
bei der Anzucht von Phagen wurden 4 g/l Maltose (LMM-Medium) oder 4 g/l Glucose (LMG-Medium) zugegeben
für Agarplatten wurden 10 g Agar pro 1 zugegeben

NZ-Medium

10 g NZ-Amine
5 g NaCl
2 g $MgCl_2$ pro 1
der pH-Wert von 7,0 wurde mit 3,4 ml NaOH eingestellt (1N)

NZY-Medium

NZ-Medium mit 5 g pro 1 Yeast-Extrakt

Top-Agar/Agarose

10 g Tryptone
5 g NaCl
7 g Agar/Agarose pro 1
der pH-Wert von 7,0 wurde mit 2 ml NaOH eingestellt (1N)

Phagen-Puffer

10 mM $MgCl_2$
20 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 7,5

Puffer für die CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation:

Puffer für kontinuierliche CsCl-Gradienten

zur Reinigung von Pflanzen-DNS/
für Actinomycin D-CsCl-Gradienten

25 mM $Na_2B_4O_7$,pH 9,2

Puffer für kontinuierliche CsCl-Gradienten

zur Reinigung von Phagen

Phagen-Puffer (s.o.)

CsCl-Puffer für Stufengradienten zur Reinigung von Phagen

20 mM Tris-HCl pH 7,5
30 mM $MgCl_2$
20 mM NaCl

Stammlösungen für die Hybridisierung:

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Na_3Citrat pH 7,0

20 x SSPE

3 M NaCl
0,02 M EDTA
0,2 M NaH_2PO_4 pH 7,0 wurde mit 5 N NaOH eingestellt

100 x Denhardt's Lösung (Denhardt, 1966)

2% Ficoll
2% Polyvinylpyrrolidon
2% BSA je (w/v)

Stammlösung DNS

1 mg/ml DNS gelöst in H_2O
es wurde niedermolekulare Heringssperma-DNS verwendet oder Kalbsthymus-DNS, die 9 x 20 sec Ultraschall-behandelt wurde (Branson Sonifier, Stufe 4)
Die DNS-Stammlösung wurde vor Gebrauch 10 min aufgekocht und sofort zur Hybridisierungslösung gegeben

Denaturierungsmedium

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungsmedium für den Southern-Transfer

3,0 M NaCl
0,5 M Tris pH 7,6 wurde mit HCl eingestellt

Neutralisierungsmedium für die Übertragung von Phagen auf Nitrozellulose

3,0 M NaCl
0,5 M Tris pH 7,4 wurde mit HCl eingestellt

Neutralisierungsmedium zur Fixierung von DNS auf Rundfiltern

2 Teile 3 M NaCl
1 Teil 1 N HCl
1 Teil 1 M Tris-HCl pH 8,0

Medien für die Ligation:

Puffer der alkalischen Phosphatase

10 mM Tris-HCl pH 8,0

Ligase-Grundpuffer zur Ligation von Plasmiden

66 mM Tris-HCl pH 7,8
6 mM $MgCl_2$

Ligase-Grundpuffer zur Ligation von Phagen-DNS

20 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM $MgCl_2$

DNS-Polymerase-Puffer

50 mM Tris
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
50 µg/ml BSA pH 7,8 wurde mit HCl eingestellt

Puffer und Lösungen für In-vitro-Verpackung und für die Präparation der In-vitro-Verpackungsmixe:

Puffer A

20 mM Tris-HCl pH 8,0
3 mM $MgCl_2$
1 mM EDTA
0,05% 2-Mercaptoethanol (v/v)

Puffer M1

11 µl H_2O
0,6 µl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
30 µl 0,05 M Spermidin/0,1 M Putrescin
0,9 µl 1 M $MgCl_2$
7,5 µl 0,1 M ATP
1 µl 2-Mercaptoethanol (1:10 verdünnt)

Putrescin (16 mg/ml) und Spermidin (34 mg/ml) wurden gemeinsam gelöst und mit 1 M Tris-HCl pH 8,0 neutralisiert
ATP wurde mit Tris-Base neutralisiert

M1-Puffer wurde in Portionen bei -20°C gelagert

2.8. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.8.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Fa. Merck mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet. Zur Anzucht von Bakterien wurden auch Chemikalien vom Reinheitsgrad "reinst" der Fa. Merck eingesetzt.

Agarose	Fa. FMC Corporation
Amberlite	Fa. Serva
Ampicillin	Fa. Serva
BSA	Fa. Sigma
Chloramphenicol	Fa. Serva
dATP, Dinatriumsalz	Fa. Boehringer
Dextransulfat	Fa. Pharmacia
dGTP, Dilithiumsalz	Fa. Boehringer
dTTP, Dinatriumsalz	Fa. Boehringer
DTT	Fa. Serva
EtBr	Fa. Serva
Ficoll 400	Fa. Pharmacia
Hepes	Fa. Serva
Heringssperma-DNS	Fa. Calbiochemicals
Kalbsthymus-DNS	Fa. Serva
2-Mercaptoethanol	Fa. Serva
Orthozid	Fa. Celamerck
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Serva

Poly(U)-Sepharose	Fa. Pharmacia
Putrescin	Fa. Sigma
Polycytidylsäure	Fa. Sigma
Quickszint	Fa. Koch-Light Laboratories
Röntgenfilmentwickler D19	Fa. Kodak
Sarkosyl NL 97	Fa. Serva
SDS	Fa. Serva
Sephadex G 50 fine	Fa. Pharmacia
Spectinomycin	Fa. Upjohn
Spermidin	Fa. Serva
Tetracyclin	Fa. Serva
Triton X-100	Fa. Serva
tRNS aus E. coli	Fa. Boehringer
Unisolve	Fa. Koch-Light Laboratories

α-^{32}P-dCTP, 2000-3000 Ci/mmol	Fa. Amersham-Buchler, Fa. NEN wurde dankenswerterweise von Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Dr. P. Blanz und Dr. A. Brennike zur Verfügung gestellt
γ-^{32}P-ATP	

2.8.2. Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden Enzyme der Fa. Boehringer verwendet.

Restriktionsenzyme	Fa. BRL, Fa. Renner; Abbau von DNS zur Klonierung erfolgte stets mit Enzymen der Fa. Boehringer
DNS-Polymerase I	Fa. Boehringer, Fa. Renner
T_4-Polynukleotid-Kinase	Fa. BRL
Proteinase K	Fa. Merck
DNase I, Reinheitsgrad I	Fa. Boehringer
DNase I, Reinheitsgrad II	Fa. Serva
Lysozym	Fa. Merck

2.8.3. Nährmedien

Agar	Fa. Difco
Yeast-Extrakt	Fa. Difco
Tryptone	Fa. Difco
NZ-Amine	Fa. Otto Aldag AG

2.8.4. Verbrauchsmaterialien

Membranfilter BA 85, 0,45 µm, Ø 24 mm	Fa. Schleicher & Schüll
Membranfilter BA 85, 0,45 µm, Ø 82 mm	Fa. Schleicher & Schüll
Membranfilter HA, 0,45 µm, Ø 13 mm	Fa. Milipore
Nitrozellulose HA, 0,45 µm	Fa. Milipore
Röntgenfilm X-omat S	Fa. Kodak
Dialyseschlauch	Fa. Serva

2.9. Abkürzungen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die gebräuchlichen Abkürzungen verwendet.

bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CHS	Chalkonsynthase
Ci	Curie
cpm	Zerfallsimpulse pro Minute
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s^2
kbp	1000 Basenpaare
moi	"multiplicity of infection"
OD...	Optische Dichte bei ... nm
pfu	"plaque forming units"
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
rpm	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
u	Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen, Volumenprozente
w/v	Gewicht pro Volumen, Gewichtsprozente
NTA	Nitriloessigsäure
PEG	Polyethylenglycoll
Poly(C)	Polycytidylsäure

3. ERGEBNISSE

3.1. Hybridisierung

Das gegen die Chalkonsynthase von Petersilie gebildete Antiserum reagiert spezifisch mit dem Chalkonsynthase-Protein von Matthiola incana (Rall, 1983), die beiden Enzym-Proteine besitzen also homologe Strukturen. Da jedoch durch die Degeneration des genetischen Codes identischen Aminosäure-Folgen unterschiedliche Nukleotid-Sequenzen zugrunde liegen können, stellt sich die Frage, ob sich diese Homologie auch auf DNS-Ebene widerspiegelt . Zur Hybridisierung wurden die cDNS-Klone pLF 12 und pLF 56 eingesetzt. Sie enthalten Chalkonsynthase-spezifische DNS, die durch reverse Transkription der mRNS aus Petersilie gewonnen wurde (Kreuzaler et al., 1983). Während pLF 12 nur ca. 500 bp des 3'-Endes der mRNS repräsentiert, umfaßt die Insert-DNS des Plasmides pLF 56 mit 1300 Nukleotiden fast die gesamte mRNS-Sequenz (Reimold et al., 1983). Die pLF 56 Insert-DNS wird vom Restriktionsenzym Pst I in Fragmente von 500 und 800 bp geschnitten.
Bei Hybridisierung zwischen heterologen DNS-Sequenzen müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß sich ein gewisser Grad an Basenfehlpaarungen ausbilden kann; die Kriterien der Hybridisierung werden damit direkt von den eingesetzten DNS-Sequenzen bestimmt.

3.1.1. Hybridisierungsbedingungen

Ein erster Hybridisierungsansatz (Hybridisierungsbedingungen I) schien die Kreuzreaktion der Chalkonsynthase-DNS-Sequenz von Petersilie mit der heterologen Matthiola-Sequenz zu zeigen: Bei Matthiola-DNS verschiedener Stämme und auch bei Petersilie-DNS entstanden nach Abbau mit Hind III DNS-Fragmente der Grössen 6,1 und 12,1 kbp, die durch komplementäre Basenpaarung mit ^{32}P-markiertem linearisiertem Plasmid pLF 56 als CHS-Gensequenzen enthaltend identifiziert wurden (Abb. 3).
Der Anteil eines "single copy"-Gens, also auch des CHS-Gens, im Genom ist gering; bei 5 µg eingesetzter Gesamt-DNS beträgt bei Matthiola (1,5 pg DNS pro haploidem Genom) die Menge eines Restriktionsfragments von 12 kbp ca. 50 pg. Unter Hybridisierungsbedingungen I und Ia lag die Nachweisgrenze nur in Ausnahmefällen in diesem Bereich. In anderen Ansätzen betrug sie 100 ng (Koch, 1982). Durch Übernahme der Hybridisierungsbedin-

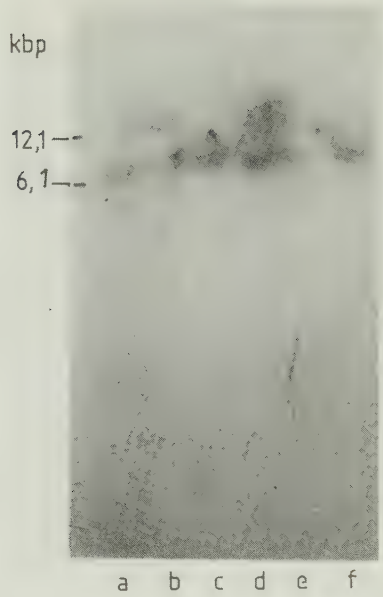


Abbildung 3: Hybridisierung Hind III-abgebauter DNS mit ^{32}P-markiertem Plasmid pLF 56 unter Hybridisierungsbedingungen I. Nach Restriktionsabbau der DNS wurden die Fragmente auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und nach der Methode von Southern auf Nitrozellulose transferiert (Southern, 1975). Das Nitrozellulosefilter wurde hybridisiert und nach den Waschvorgängen auf Röntgenfilm exponiert. Dargestellt ist die Autoradiografie (Southern-Hybridisierung).
Expositionsdauer: 4 Tage.
a DNS aus Matthiola Linie 06 (Samen),
b DNS aus Matthiola Linie 06 (Blüten),
c DNS aus Matthiola Linie 04 (Blüten),
d DNS aus Matthiola Linie 18 (Samen),
e DNS aus Petersilie,
f DNS aus Matthiola Linie 06 (Keimlinge).

gungen, die bei ähnlichen Versuchen zum Nachweis der Chalkonsynthase-Sequenz in Antirrhinum majus mit Hilfe von pLF 56 erfolgreich eingesetzt wurden (Hybridisierungsbedingungen II, Wienand et al., 1982), konnte die Empfindlichkeit der Hybridisierung auf den sicheren Nachweis von 50 pg gesteigert werden (Abb. 4). Unter diesen Bedingungen gelang auch erstmals die Hybridisierung von Matthiola-DNS mit über Saccharosegradienten oder durch Gelelektrophorese gereinigter Insert-DNS aus pLF 56. Die höhere Empfindlichkeit der Hybridisierung wird durch den Zusatz von Dextransulfat zum Hybridisierungsmedium bedingt.

Auffallend ist bei der in Abb. 4 dargestellten Hybridisierung das Signal Hind III-abgebauter DNS aus Stamm 18 (5,9 kbp), das in der Intensität der 250 pg-Probe des Plasmids entspricht. Die in der Lage damit übereinstimmenden Banden der Stamm 17-DNS und die hybridisierenden Fragmente des Eco RI-Abbaus geben dagegen Hybridisierungsantwort in der Stärke der 50 pg-Plasmid-Probe. Auch hier ist die Antwort der DNS aus Stamm 18 stärker als die der DNS aus Matthiola Stamm 17.

3.1.2. Hybridisierungsmuster

Abb. 5 zeigt, daß sich DNS aus dem Stamm ohne meßbare Chalkonsynthase-Aktivität (Stamm 18) von der DNS aus Stamm 04, einem Stamm, der Chalkonsynthase-Aktivität besitzt, im Hybridisierungsmuster in Bezug auf die benutzten Restriktionsenzyme nicht wesentlich unterscheidet. Offensichtlich ist dies für den Hind III-Abbau (Abb. 5a), bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert auch für den Eco RI-Abbau (Abb. 5B, b) und bei Hybridisierung mit pLF 12-Insert-DNS für den Bam HI-Abbau (Abb. 5A, c). Die Differenz im Muster beim Bam HI-Abbau ist durch Unregelmäßigkeiten im Transfer der DNS auf Nitrozellulose und bei der Hybridisierung erklärbar (unterschiedlich effiziente Übertragung niedermolekularer DNS und verschieden starker Hybridisierungshintergrund); diese Unterschiede treten in anderen Versuchen nicht auf (vgl. Abb. 9, B). In Abb. 4 scheinen sich die Hybridisierungsmuster aus den Matthiola-Stämmen 17 (Wildtyp in bezug

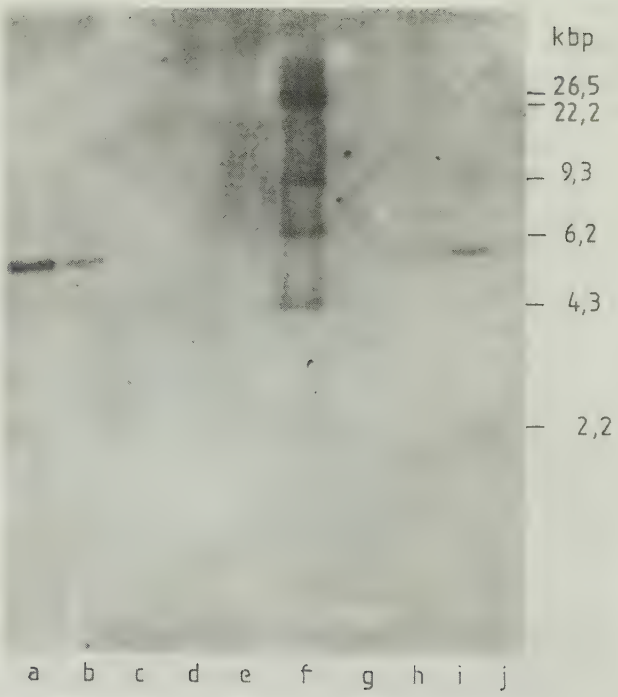


Abbildung 4: Nachweisgrenze bei Southern-Hybridisierung.
Zur Hybridisierung wurde ^{32}P-markierte pLF 56-Insert-DNS unter Hybridisierungsbedingungen I-I eingesetzt (Expositionsdauer 6 Tage mit Verstärkerfolie).
a-e: pLF 56-DNS, Eco RI geschnitten;
a 1 ng;
b 250 pg;
c 100 pg;
d 50 pg;
e 10 pg;
f Marker λ/Hind III;
g Matthiola-DNS, Linie 18 (Keimlinge), Eco RI, 5 µg;
h Matthiola-DNS, Linie 17 (Keimlinge), Eco RI, 5 µg;
i Matthiola-DNS, Linie 18 (Keimlinge), Hind III, 5 µg;
j Matthiola-DNS, Linie 17 (Keimlinge), Hind III, 5 µg.

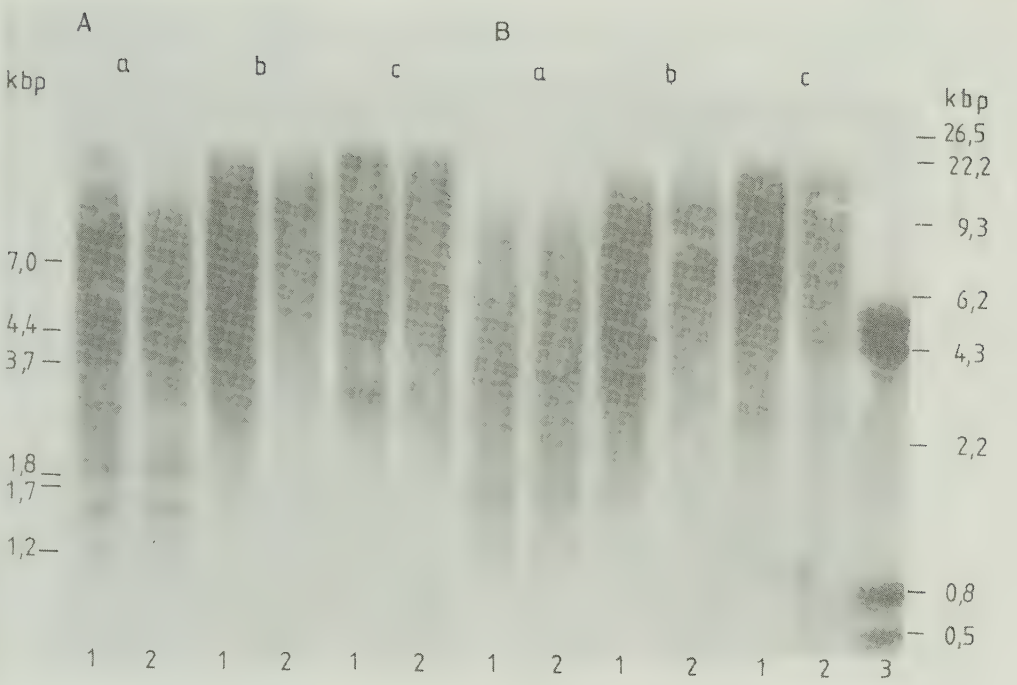


Abbildung 5: Southern-Hybridisierung von Matthiola-DNS mit ^{32}P-markierter pLF 12-Insert-DNS (A) und pLF 56-Insert-DNS (B). Expositionsdauer: A: 12 h, B: 3 Tage mit Verstärkerfolie.
a Abbau mit Hind III; b Abbau mit Eco RI; c Abbau mit Bam HI.
1 DNS aus Matthiola-Linie 04 (Blüten), 5 µg;
2 DNS aus Matthiola-Linie 18 (Blüten), 5 µg;
3 1 ng pLF 56-DNS/Pst I.

auf die CHS-Aktivität) und 18 isolierter DNS-Proben auf den ersten Blick zu unterscheiden, jedoch stimmt lediglich die Stärke der Hybridisierung nicht überein (Banden bei Hind III-Abbau: 5,9 kbp, 6,1 kbp; beim Eco RI-Abbau: 5,7 kbp, 6,2 kbp, 6,9 kbp). Allerdings ist die beim Eco RI-Abbau der DNS des Stamms 18 auftretende Bande bei 3,8 kbp beim Abbau der DNS aus dem Stamm 17 nicht eindeutig zu erkennen. Da bei anderen Hybridisierungsversuchen keine entsprechenden Unterschiede bei Eco RI-abgebauter DNS auftreten, kann diesem Ergebnis keine Bedeutung zugemessen werden. Die Mutation des Chalkonsynthase-Gens der Matthiola-Linie 18 beeinflußt also das Restriktionsenzym-Schneidemuster der DNS-Sequenzen, die unter den gegebenen Hybridisierungsbedingugnen mit pLF 12/pLF 56-Insert-DNS Hybride bilden, nicht.

Da der cDNS-Abschnitt des Plasmids pLF 12 nur den relativ zur mRNS 3'-wärts gelegenen Teil der cDNS-Sequenz des Plasmids pLF 56 enthält, kann mit dieser 3'-spezifischen Probe den hybridisierenden Fragmenten der Matthiola-DNS eventuell ein bestimmter Genbereich zugeordnet werden. Die Hybridisierungsmuster Hind III-abgebauter DNS mit pLF 12- bzw. pLF 56-Insert-DNS unterscheiden sich jedoch nicht (Abb. 5; Ausnahme: Banden kleiner als 1 kbp). Beim Bam HI-Abbau treten die mit pLF 56-Insert-DNS deutlich hybridisierenden Banden von 7,4 kbp und 3,0 kbp auch bei Hybridisierung mit pLF 12-Insert-DNS auf. Die insgesamt stärkere Hybridisierung mit pLF 12-Insert-DNS, die vor allem den höhermolekularen DNS-Bereich betrifft, ist wohl eine Eigenschaft dieser speziellen nicktranslatierten Probe. Sie kann auch den Unterschied bei der Hybridisierung Eco RI-abgebauter DNS bewirken. Übereinstimmend tritt hier die Bande von 3,7 kbp auf. Vergleich verschiedener Hybridisierungen zeigt jedoch, daß auch beim Eco RI-Abbau für pLF 12- und pLF 56-Insert-DNS ein einheitliches Muster entsteht (Abb. 6). Wie beim Hind III-Abbau ergeben sich jedoch Unterschiede in Stärke und Häufigkeit des Auftretens hybridisierender Fragmente im niedermolekularen DNS-Bereich. Dieser Unterschied kann durch unterschiedliche physikalische Eigenschaften der beiden radioaktiv markierten DNS-Proben (Größe der Fragmente, Anteil Poly(C))

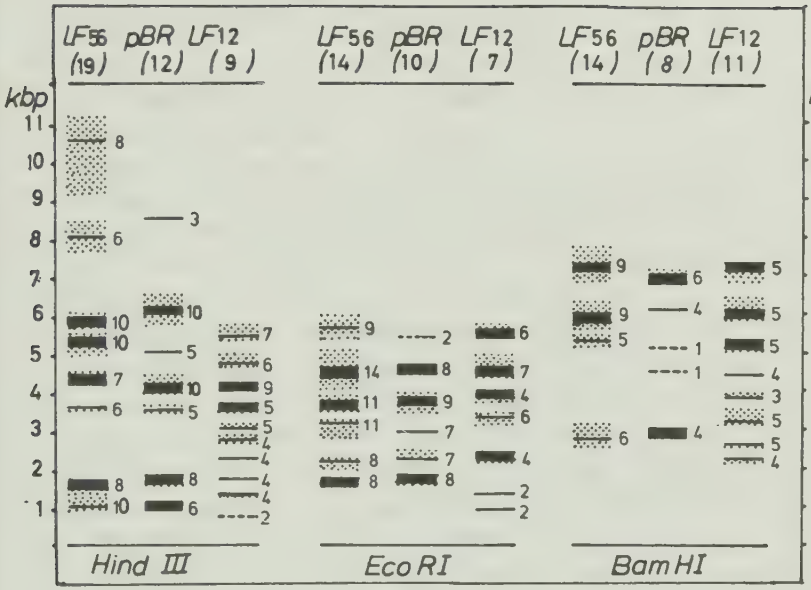


Abbildung 6: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse verschiedener Ansätze. Die Hybridisierung wurde unter Hybridisierungsbedingungen II, zum Teil unter Zusatz von Poly(C) (10 µg/ml), ausgeführt.
Die mit DNS der Matthiola-Linien 04, 17 und 18 erhaltenen Ergebnisse wurden zusammengefaßt. Nicht alle in die Grafik einbezogenen Einzelergebnisse sind im Bild dargestellt.
Die Zahlen geben die Gesamtzahl der ausgewerteten Hybridisierungen bzw. die Häufigkeit des Auftretens einer Bande an.
Die Intensität der Hybridisierung wird durch die Stärke des Balkens wiedergegeben. Die punktierte Region gibt den Schwankungsbereich der Größenbestimmung an; Durchschnittswerte wurden ohne Gewichtung gebildet.

bedingt sein. In der schematischen Darstellung der bei verschiedenen Hybridisierungen auftretenden Banden (Abb. 6) fällt auf, daß beim Bam HI-Abbau nach Hybridisierung mit pLF 12-Insert-DNS im Bereich von 4,5 bis 3 kbp Banden auftreten, die keine Entsprechung bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS haben. Da aber mit dem kleineren cDNS-Fragment aus pLF 12 keine CHS-Sequenzen erkannt werden können, die nicht auch homolog zu pLF 56-Insert-DNS sind, müssen diese Signale einer unspezifischen Reaktion zugeschrieben werden. Durch Hybridisierung mit pLF 12-Insert-DNS war es nicht möglich, die 3'-Region des CHS-Gens einem bei Hybridisierung aufleuchtenden Matthiola-DNS-Fragment zuzuordnen.

In die Übersicht der Ergebnisse verschiedener Hybridisierungsansätze (Abb. 6) wurde das Ergebnis der Hybridisierung Eco RI-abgebauter DNS aus Abb. 4 nicht aufgenommen, da diese Banden schwach sind und nur bei diesem Versuch auftraten. Sie entstanden vermutlich durch unvollständigen Abbau der DNS (6,9 kbp, 6,2 kbp, 5,7 kbp). Rechnet man die Größe der bei den Hybridisierungen am häufigsten und stark reagierenden Banden zusammen, so ergibt sich beim Eco RI-Abbau eine Größe von 9,8 kbp für die von Insert-DNS erkannte Matthiola-DNS. Beim Hind III-Abbau werden DNS-Fragmente einer Gesamt-Größe von 17,1 kbp und beim Bam HI-Abbau von 13,1 kbp durch pLF 56-Insert-DNS markiert. Da in diesen Fällen aber das Bandenmuster bei verschiedenen Versuchen stark variiert und Banden alternativ auftreten, z.B. die Bande von 5,9 kbp oder die von 5,4 kbp beim Hind III-Abbau (Abb. 6), liegt es nahe, die größere der beiden Banden als Ergebnis eines unvollständigen Restriktionsabbaus zu deuten (allerdings treten in vier Fällen auch beide Banden gleichzeitig und in vergleichbarer Stärke auf). Die insgesamt 1,3 kbp große von cDNS gebildete Insert-Sequenz aus pLF 56 kann die 9,2 kbp Matthiola-DNS, die beim Eco RI-Abbau auf drei Fragmente verteilt sind, erkennen, wenn man davon ausgeht, daß die genomische CHS-Gen-Sequenz im von der cDNS überstrichenen Bereich ein Intron enthält. Dies wurde für Petersilien-DNS gefunden und ist somit auch bei Matthiola nicht ausgeschlossen.

Da die verschiedenen Matthiola-Stämme bezogen auf die Gene der

Anthocyanbiosynthese homozygot sind, ist es unwahrscheinlich, daß sich für das CHS-Gen beim Abbau mit Restriktionsenzymen für jedes vorhandene Allel andere Fragmente ergeben. Durch Hybridisierung ergibt sich also die Charakteristik genau eines Gens.

Bei den Hybridisierungen mit Insert-DNS aus pLF 12 oder pLF 56 fallen drei Dinge auf:

1) Matthiola-DNS gibt zum Teil auch dann klare Hybridisierungsbanden, wenn sie nicht oder unvollständig abgebaut ist (Abb. 7).
2) Bei grundsätzlicher Übereinstimmung der Lage hybridisierender Banden variiert die Stärke der Hybridisierung mit der DNS-Präparation (Abb. 4, vgl. auch Abb. 8).
3) Es reagiert der pBR 322-Anteil des als Hybridisierungsstandard eingesetzten Pst I-geschnittenen pLF 56-Plasmids deutlich. D.h., daß die Insert-DNS, die radioaktiv markiert wurde, auch einen Vektor-Plasmid-Anteil enthält (Abb. 5).

Daher war zunächst die Frage zu klären, ob pBR 322-DNS unter den bisher gewählten Bedingungen mit Matthiola-DNS Hybride bilden kann.

3.1.3. Vergleich der Hybridisierung von pBR 322- und pLF 56-Insert-DNS mit DNS aus Matthiola incana

Abb. 8 zeigt die Autoradiographie der Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter Matthiola-DNS, die mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI geschnitten und zum einem mit ^{32}P- markierter Insert-DNS (Abb. 8 B) und zum anderen mit radioaktiv markiertem Plasmid pBR 322 (Abb. 8 A) hybridisiert wurde. Die Lage der am stärksten hybridisierenden Banden stimmt überein. Während bei Hybridisierung mit pBR 322-DNS die Hybridisierungsantwort der Pflanzen-DNS stärker ist als die des linearisierten Plasmids pLF 56, ist bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS die Pflanzen-DNS-Bande schwächer als die des Hybridisierungsstandards (Bahn 3). D.h. die Hybridisierungssignale der Matthiola-DNS mit pBR 322 sind absolut und relativ stärker als die Signale mit der Insert-DNS. Die gefundene Hybridisie-

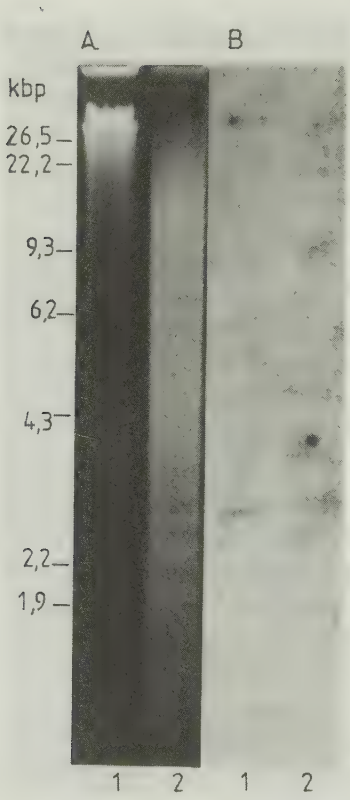


Abbildung 7: Southern-Hybridisierung von Matthiola-DNS mit ^{32}P-pLF 56- Insert-DNS unter Hybridisierungsbedingungen II (Expositionsdauer: 5 Tage mit Verstärkerfolie).
A EtBr-gefärbtes Gel; B Autoradiografie nach Southern-Hybridisierung.
1 Matthiola-DNS, Linie 18 (Keimlinge), Eco RI-inkubiert;
2 Matthiola-DNS, Linie 17 (Keimlinge), Eco RI-verdaut.

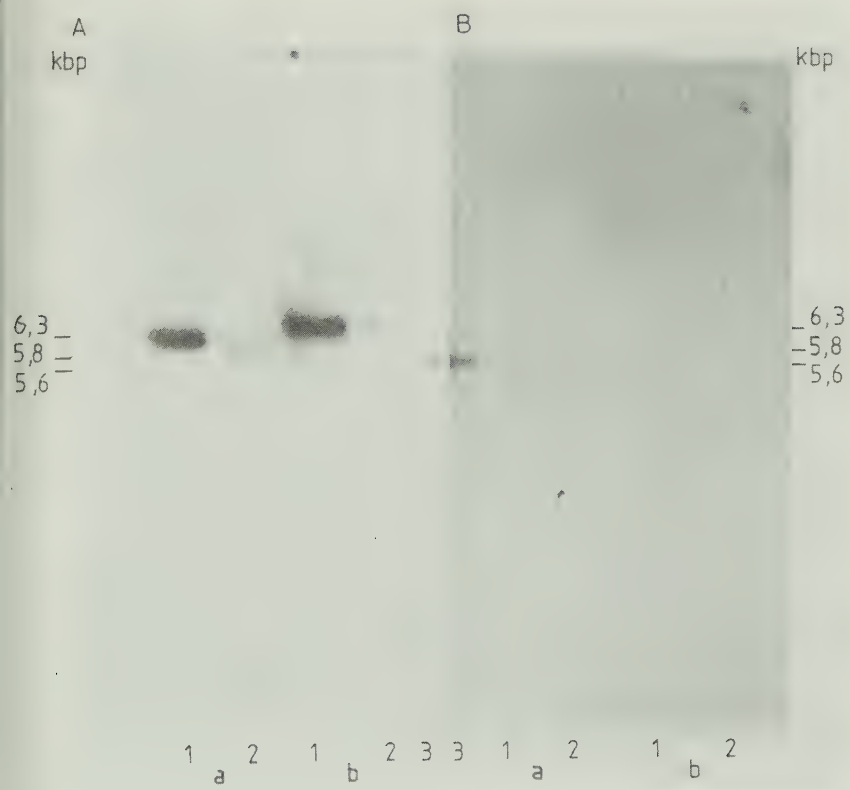


Abbildung 8: Southern-Hybridisierung von Matthiola-DNS mit ^{32}P-markierter pBR 322 -DNS (A), bzw. mit ^{32}P-markierter Insert-DNS aus pLF 56 (B) unter Hybridisierungsbedingungen II (Expositionsdauer: A: 18 h, B: 48 h, jeweils mit Verstärkerfolie).
a Abbau mit Hind III;
b Abbau mit Bam HI.
1 Matthiola-DNS aus Linie 18 (Keimlinge), 5 µg;
2 Matthiola-DNS aus Linie 17 (Keimlinge), 5 µg;
3 pLF 56/Eco RI, 1 ng.

rung kann deshalb nicht Ausdruck spezifischer Paarung von CHS-Gen-Sequenzen mit der cDNS aus Petersilie sein. Die Matthiola-DNS bindet im Fall der in Abb. 8 B gezeigten Hybridisierung sichtbar nur die in der Insert-DNS-Präparation als Verunreinigung enthaltene pBR 322-DNS. Ein entsprechendes Ergebnis wird erhalten, wenn ein Histonsequenzen von Psammechinus enthaltendes Plasmid (Schaffner et al., 1978) zur Hybridisierung eingesetzt wird: Bam HI-, Eco RI- und Hind III-abgebaute Matthiola-DNS gibt bei Hybridisierung mit diesem Plasmid und mit elektrophoretisch gereinigtem 500 bp-Pst I-Fragment aus pLF 56 identische Muster (Abb. 9). Diese Muster stimmen mit den bei verschiedenen Hybridisierungen mit Insert-DNS (pLF 12, pLF 56) und mit pBR 322 erhaltenen überein (Abb. 6). pBR 322-DNS geht mit Matthiola-DNS also eine Basen-komplementäre Bindung ein, die so stark ist, daß eine Bindung von pLF 56-Insert-DNS an die CHS-Sequenz von Matthiola nicht wahrgenommen wird.
Nicht verwunderlich ist, daß die DNS aus den Matthiola-Stämmen 04 und 18 in Bezug auf das Vorhandensein von mit pBR 322 kreuzhybridisierenden Sequenzen übereinstimmen (Abb. 9). Die unterschiedliche Intensität der Hybridisierung in Abb. 4 und Abb. 8 ist nicht verbunden mit dem Merkmal "Keine CHS-Aktivität" des Stammes 18 oder mit Eigenschaften des Stammes 17, sondern eine Eigenart der DNS-Präparation. Die Abhängigkeit der Stärke der Hybridisierung von der DNS-Präparation und das Auftreten von hybridisierenden Banden auch ohne völligen Abbau der DNS mit Restriktionsenzymen deuten darauf hin, daß die mit pBR 322 kreuzhybridisierenden Sequenzen der Matthiola-DNS eventuell aus Organellen-DNS bestehen. Ihr Anteil kann von DNS-Präparation zu DNS-Präparation variieren, und sie kann auch ohne Abbau mit Restriktionsenzymen nach Agarose-Gelelektrophorese und Hybridisierung distinkte Banden bilden.
Werden Hybridisierungen mit pBR 322-DNS durchgeführt, kommt es zu keiner Hybridisierungsantwort der Insert-Sequenzen des als Hybridisierungsstandard aufgetragenen Pst I-geschnittenen Plasmids pLF 56 (Abb. 9). Das zeigt, daß Insert- und pBR 322-DNS nicht komplementär zueinander sind und beide DNS-Sequenzen im Matthiola-Genom mit unterschiedlichen DNS-Abschnitten Hybride

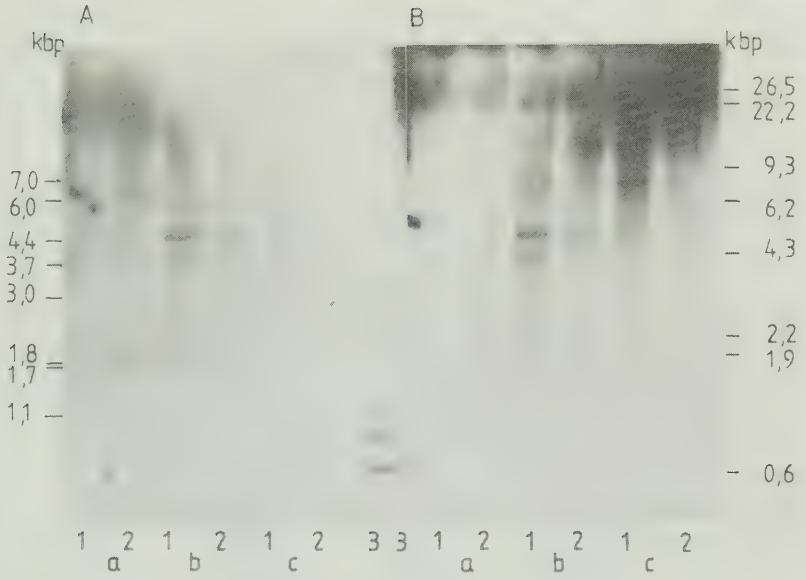


Abbildung 9: Southern-Hybridisierung von Matthiola-DNS mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS (A; 500 bp-Pst I-Fragment) und mit ^{32}P-markiertem die h22-Histon-Sequenz enthaltendem pBR 322 (B; Schaffner et al., 1978).
a Hind III-Abbau;
b Eco RI-Abbau;
c Bam HI-Abbau.
1 Matthiola-DNS der Linie 04 (Blüten), 5 µg;
2 Matthiola-DNS der Linie 18 (Blüten), 5 µg;
3 pLF 56/Pst I, 1 ng.

bilden müßten. Die bei der Insert-Hybridisierung auftretenden Banden müssen also als Reaktion mit kontaminierenden pBR 322-Sequenzen gedeutet werden.

3.1.4. Spothybridisierung

Da sich die Sequenzen von pBR 322 und pLF 56-Insert soweit unterscheiden, daß sie nicht miteinander hybridisieren, könnten veränderte Hybridisierungsbedingungen die Reaktion der Insert-DNS-Sequenz mit ihren komplementären Abschnitten auf der Pflanzen-DNS relativ zu der Reaktion der pBR 322-Sequenz verstärken. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde auf Filtern fixierte Gesamt-DNS aus Matthiola unter verschiedenen Bedingungen mit ^{32}P-markierter pBR 322- bzw. Insert-DNS aus pLF 56 hybridisiert (Abb. 10).
Erstaunlicherweise zeigt die Insert-Sequenz nur bei niedrigen Hybridisierungstemperaturen (unter Berücksichtigung des Formamid-Anteils 53,5-58,5°C) eine Reaktion mit der Matthiola-DNS. Eine Bindung der Plasmid pBR 322-DNS ist dagegen auch noch bei (umgerechnet) 63,5°C sichtbar. Die stärkste Reaktion der Pflanzen-DNS mit pBR 322-DNS bei (umgerechnet) 63,5°C ist genauso stark wie die stärkste Reaktion mit pLF 56-Insert-DNS bei (umgerechnet) 58,5°C.
Eine relativ stärkere Hybridisierung der Insert-DNS gegenüber der pBR 322-Sequenz zeigt sich bei (umgerechnet) 58,5°C. Diese Tendenz wurde durch eine Gegenüberstellung der unter diesen Bedingungen gebundenen Radioaktivität bei Verwendung von ^{32}P-markierter Insert-DNS oder pBR 322-DNS bestätigt (Ergebnis nicht dargestellt).
Die in diesen Versuchen als optimal für die Hybridisierung von Matthiola-DNS mit pLF 56-Insert-Sequenz bestimmte Hybridisierungstemperatur von (umgerechnet) 58,5°C weicht nicht sonderlich von der zuvor benutzten Temperatur-Bedingung von 60°C ab. Die bisher dargestellten Versuche wurden also unter Bedingungen ausgeführt, die eine Erkennung von CHS-Sequenzen möglich machen würden.
Weiteren Aufschluß über Stabilität und Spezifität der Bindung

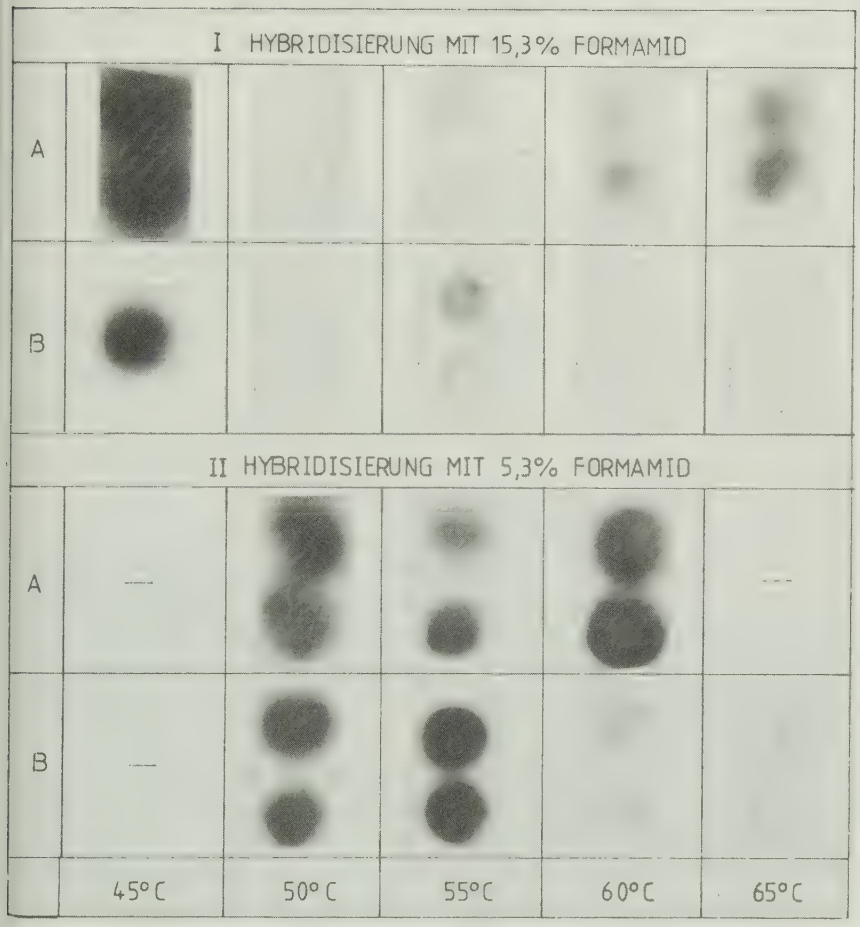


Abbildung 10: Hybridisierung von je 5 µg filtergebundener Matthiola-DNS (Linie 04, Blüten) mit
A ^{32}P-markierter pBR 322-DNS;
B ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS.
Angegeben sind die realen Hybridisierungstemperaturen; sie erhöhen sich, wenn die Formamid-Konzentration eingerechnet wird, um 10,3°C (I) bzw. 3,5°C (II; 1% Formamid erniedrigt den Schmelzpunkt doppelsträngiger DNS um ca. 0,6-0,7°C).
Das Hybridisierungsmedium entsprach bis auf den Zusatz von Formamid dem der Hybridisierungsbedingungen II.

zwischen Matthiola-DNS und der Insert-DNS aus pLF 56 bzw. pBR 322-DNS sollte aus den Schmelzkurven dieser Hybride gewonnen werden.

3.1.5. Schmelzkurven

Es wurden Schmelzkurven aufgenommen mit filtergebundener, pBR 322-Sequenzen enthaltender E. coli-DNS als Positiv-Kontrolle für die Hybridisierung mit pBR 322, mit filtergebundener Insert-DNS aus pLF 56 als Positiv-Kontrolle für die Hybridisierung mit pLF 56-DNS, mit filtergebundener Antirrhinum- (Wienand et al.,1982) und Matthiola-DNS als Beispielen für Chalkonsynthase-Sequenzen enthaltende DNS-Arten und mit filtergebundener Kalbsthymus-DNS, die als Negativ-Kontrolle in beiden Hybridisierungsansätzen diente.

Hybridisierung mit ^{32}P-markiertem pBR 322
Durch E. coli-DNS und pLF 56-Insert-DNS wurde in diesem Ansatz die meiste Radioaktivität gebunden. Aber auch Antirrhinum- und Matthiola-DNS und Kalbsthymus-DNS bindet radioaktiv markiertes Plasmid pBR 322 (Tab. 2). In ihrem Schmelzverhalten kann man die nicht homologen DNS-Proben aus Kalb und aus den beiden Pflanzen dem Verhalten der homologen E. coli- + pBR 322-DNS gegenüberstellen. Obwohl sich die T_m-Werte nur wenig unterscheiden (Tab. 2), zeigen die nicht homologen Proben (Matthiola-, Antirrhinum- und Kalbs-DNS) doch einheitlich ein Freisetzen der Radioaktivität bei niedrigeren Temperaturen als die E. coli/pBR 322-DNS (Abb. 11A). Dies ist bei Paarung nur teilweise übereinstimmender Sequenzen zu erwarten. Die pLF 56-Insert-DNS folgt in den niedrigen Temperaturbereichen dem Verhalten der E. coli-DNS, um dann bei 80°C Werte wie die Kalbs- und Pflanzen-DNS zu erreichen. Da die Paarung in diesem Fall auf dem Vorhandensein von pBR 322-Resten in der pLF 56-Insert-DNS beruhen muß (vgl. 3.1.3.), es sich also um Paarung homologer Sequenzen handelt, kann dieses von der E. coli/pBR 322-DNS abweichende Verhalten nur so erklärt werden, daß die pBR 322-Sequenzen hier in Bruchstücken von 500-1000 Basen fixiert werden (Einfluß der Länge eines gebildeten Hybrids auf sein

Tabelle 2: Schmelzkurven.

DNS-Art	gebundene cpm	unspezifisch gebundene[1] cpm/%	bei 100°C nicht freigesetzte cpm/%	T_m-Wert °C
Hybridisierung mit ^{32}P-markiertem Plasmid pBR 322.				
E. coli	26 000	1 890/7	367/1	80,5
pLF 56-Insert	4 740	313/7	55/1	79,5
Kalb	6 450	384/6	88/1	79,5
Matthiola	6 500	553/9	87/1	79,0
Antirrhinum	5 440	397/7	59/1	80,0
Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Insert-DNS aus pLF 56.				
E. coli	13 880	1 120/8	530/4	82,5
pLF 56-Insert	7 030	500/7	190/3	78,0
Kalb	2 180	241/11	804/12	80,5
Matthiola	2 570	237/9	230/9	76,5
Antirrhinum	1 570	180/12	195/12	77,0

[1] Als unspezifisch gebunden wird die Radioaktivität bezeichnet, die bei 55°C freigesetzt wird.

Die Werte sind jeweils auf 5 µg Filter-gebundene DNS bezogen, lediglich im Fall der pLF 56-Insert-DNS wurden 10 ng DNS pro Filter fixiert. Angegeben sind die Mittelwerte von drei hybridisierten Filtern.
Die Hybridisierung wurde unter Hybridisierungsbedingungen II ausgeführt, dem Medium waren 100 µg/ml Kalbs-DNS und 10 µg/ml pBR 322 zugesetzt; die spezifische Radioaktivität beider ^{32}P-markierter DNS-Proben betrug 5×10^7 cpm/µg.
Die Schmelzkurven wurden, wie in 2.6. beschrieben, in 1 x SSC aufgenommen.

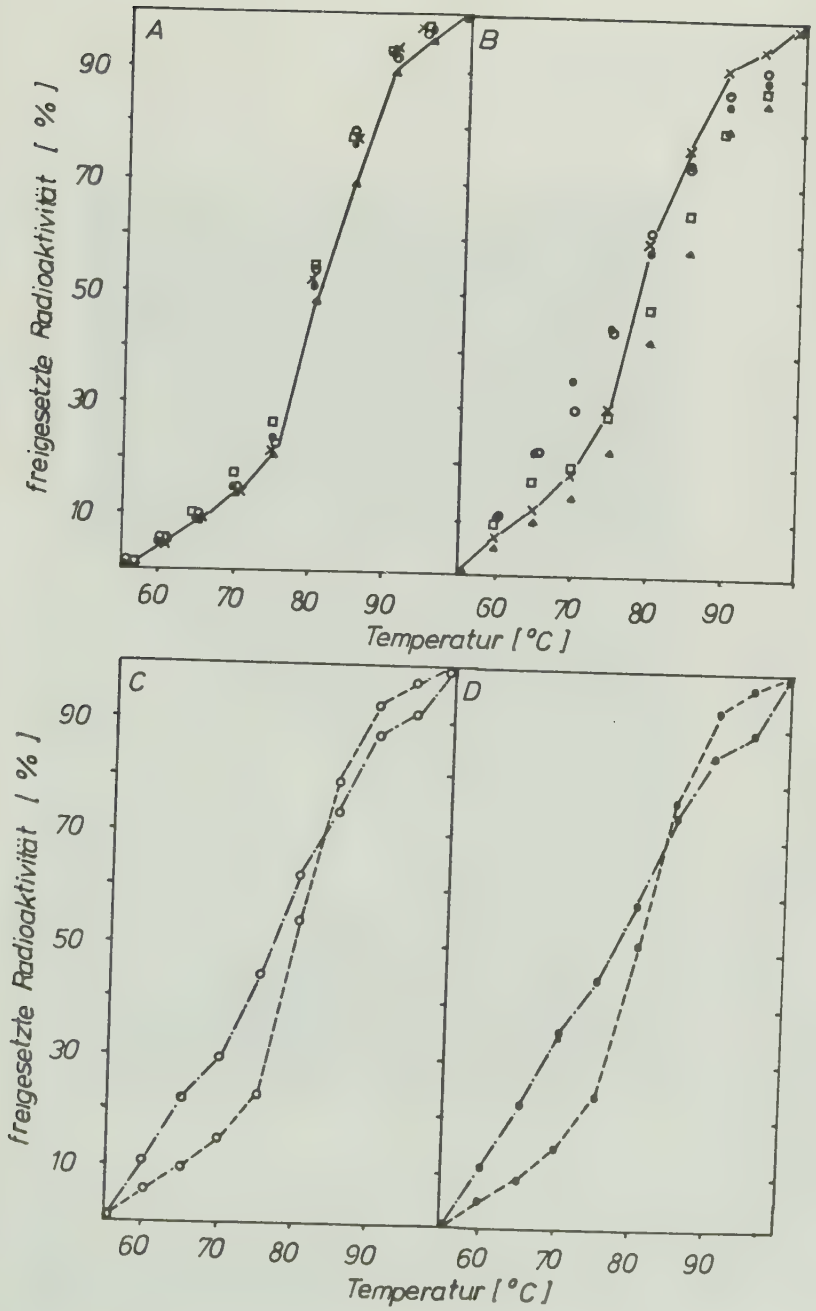
Schmelzverhalten; Beltz et al., 1983).
Diese Ergebnisse zeigen, daß unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen (60°C, 3 x SSPE, Dextransulfat) zu pBR 322-Abschnitten komplementäre Sequenzen in eukaryontischer DNS erkannt werden können, und daß diese Hybride mit T_m-Werten um 80°C stabil sind.

Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS
Das Insert/Insert-Hybrid weist einen Schmelzpunkt von 78°C auf und ist damit weniger stabil als das E. coli/pBR 322 (=pBR/pBR-)-Hybrid. Der Schmelzkurvenverlauf (Abb. 11B) zeigt, daß die Insert-Sequenz aus Komponenten mit unterschiedlicher Stabilität besteht; ein erst bei hohen Temperaturen (ab 95°C) abschmelzender Anteil wird von den beim Tailing der cDNS entstandenen Poly(C)/Poly(G)-Enden gebildet.
Die vier anderen DNS-Arten binden ebenfalls radioaktiv markierte pLF 56-Insert-DNS. Den höchsten Wert gebundener Radioaktivität erreicht die E. coli-DNS. Die Schmelzkurve des gebildeten Hybrids folgt der bei Hybridisierung mit reiner Plasmid pBR 322-DNS erhaltenen, d.h. auch hier wurde die in der Insert-DNS mitgeschleppte pBR 322-DNS gebunden. Da Kalbsthymus-DNS keine Homologien zur CHS-Gensequenz aufweist, handelt es sich bei der Bindung ^{32}P-markierter Insert-DNS möglicherweise um eine unspezifische Reaktion. Gegenüber der Hybridisierung mit pBR 322-DNS verändert sich im wesentlichen der Anteil auch noch bei 100°C gebundener Radioaktivität. Diese Bindung beruht wohl auf Poly(C)/Poly(G)-Abschnitten im Kalbsgenom (Abb. 11B). Das

---

Abbildung 11: Schmelzkurven der Hybride aus pBR 322- bzw. pLF 56-Insert-DNS mit DNS aus E. coli/pBR 322, pLF 56, Matthiola, Antirrhinum und Kalb.

A: Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pBR 322-DNS.
B: Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS.
C: Schmelzkurven der Hybride aus Matthiola-DNS und pBR 322-DNS (- - - - - - - -) und aus Matthiola-DNS und pLF 56-Insert-DNS (— · —).
D: Schmelzkurven der Hybride aus Antirrhinum-DNS und pBR 322-DNS (- - - - -) und aus Antirrhinum-DNS und pLF 56-Insert-DNS (— · — · —).
Die Schmelzkurven wurden in 1 x SSC erstellt.
Filtergebundene DNS: Matthiola o , Antirrhinum • , Kalb □ , pLF 56-Insert x , E. coli-DNS mit pBR 322-Anteil ▲ .


A
B
C
D
freigesetzte Radioaktivität [%]
90
70
50
30
10
60
70
80
90
Temperatur [°C]

Schmelzverhalten der beiden pflanzlichen, CHS-Gensequenzen enthaltenden DNS-Proben unterscheidet sich eindeutig von dem der anderen DNS-Proben (Abb. 11B). Bis zu einer Temperatur von 75°C wird ein größerer Prozentsatz Radioaktivität freigegeben als bei allen anderen DNS-Arten. Bei darüber liegenden Temperaturen gleicht der Kurvenverlauf dem bei filterfixierter Insert-DNS, um dann wie bei Kalbs-DNS abzuknicken, was darauf schließen läßt, daß auch hier Hybride mit "Clustern" von G-C-Paaren gebildet werden.
Bei allen drei eukaryontischen DNS-Proben bleiben bei 100°C noch rund 10% der in den Hybriden gebildeten Bindungen intakt. CHS-Gensequenzen enthaltende DNS unterscheidet sich also von solcher DNS, die nur Bindungen mit pBR 322-Sequenzen oder mit G/C-Clustern der angebotenen radioaktiv markierten Probe eingehen kann, dadurch, daß sie bei niedrigen Temperaturen aufschmelzende Hybride ausbildet. Der niedrige Schmelzpunkt der Hybride mit Matthiola- und Antirrhinum-DNS kann damit erklärt werden, daß eine heterologe, aus Petersilie stammende, CHS-Gensequenz benutzt wurde.Sowohl in der Menge gebundener markierter DNS als auch in den T_m-Werten der Hybride mit pLF 56-Insert-DNS und pBR 322-DNS unterscheiden sich Antirrhinum und Matthiola nur wenig. Während jedoch das Verhalten beider für die pBR 322-DNS deckungsgleich ist (Abb. 11A), scheint bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS die weniger stabile DNS-Komponente (- die den Unterschied zu Kalbsthymus-DNS-gebundenen pLF 56-DNS-Anteilen ausmacht -) bei Matthiola-DNS bereits bei 70°C entfernt zu sein (Abb. 11C), bei Antirrhinum-DNS erst 5°C darüber (Abb. 11D). Dies stimmt damit überein, daß in einem analogen Versuch ein um 0,7°C erhöhter T_m-Wert von Antirrhinum- gegenüber Matthiola-DNS bestimmt wurde. Allerdings wurden in diesem Fall nur geringe Radioaktivitätswerte gebunden (180 cpm/5 µg DNS bei Antirrhinum, 140 cpm/5µg DNS bei Matthiola), so daß hier sichere Aussagen nicht möglich waren.

Die zur Hybridisierung eingesetzte pLF 56-Insert-DNS enthält also drei Komponenten:

- Eine Poly(dC)/Poly(dG)-Sequenz; sie wird von eukaryontischer DNS spezifisch gebunden und schmilzt bei 100°C nicht voll-

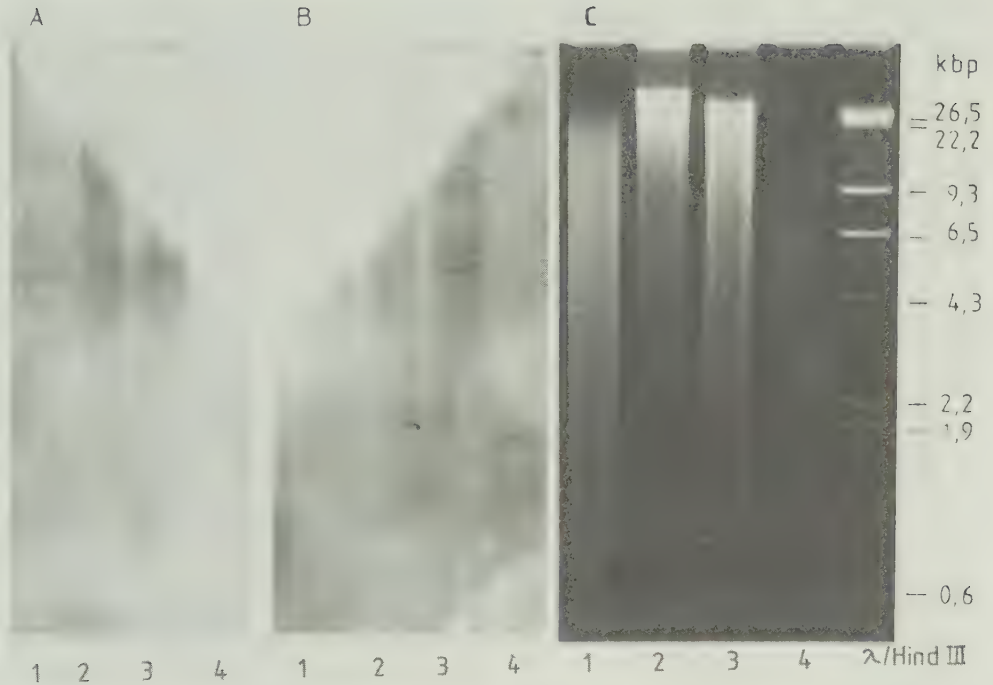


Abbildung 12: Vergleich der Hybridisierung Eco RI-abgebauter Pflanzen-DNS mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS bei unterschiedlichen Hybridisierungsbedingungen.
A Autoradiografie, Hybridisierungsbedingungen III mit Poly(C), Exposition 72 h mit Verstärkerfolie;
B Autoradiografie, Hybridisierungsbedingungen II ohne Poly(C), Exposition 80 h mit Verstärkerfolie;
C EtBr-gefärbtes Gel.
1 Matthiola-DNS, Linie 04 (Sprosse), 5 µg; 2/3 Antirrhinum-DNS, Linie 4/1 (Sprosse), 5 µg;
4 Petersilien-DNS (Blätter), ca. 2 µg.

ständig ab.

- Die pBR 322-DNS (als Verunreinigung; unabhängig davon, ob die Insert-Sequenz über Saccharose-Gradientenzentrifugation oder durch Gelelektrophorese gereinigt wurde); sie wird von eukaryontischer DNS gebunden; der T_m-Wert der Hybride liegt für Kalbs-, Matthiola- und Antirrhinum-DNS zwischen 79°C und 80°C.
- Die für das CHS-Gen aus Petersilie codierende Sequenz; sie wird lediglich von Pflanzen-DNS gebunden; der niedrige Schmelzpunkt der Hybride deutet auf die Paarung heterologer Sequenzen hin.

3.1.6. Hybridisierung bei für pLF 56-DNS/Matthiola-DNS-Hybride optimierten Bedingungen (Hybridisierungsbedingungen III)

Aufgrund der niedrigen T_m-Werte der Hybride aus CHS-spezifischer pLF 56-Insert-DNS und Matthiola-DNS scheint die bei Spothybridisierung gefundene Verstärkung der Hybridisierung bei (umgerechnet) 58,5°C (= 55°C + 5,3% Formamid) wirklich auf einer spezifischen Reaktion zu beruhen. Deshalb wurden im folgenden Hybridisierungen bei dieser Temperatur ausgeführt. Auch unter diesen Bedingungen blieb die Nachweisgrenze von 50 pg DNS erhalten (Ergebnis nicht dargestellt). Eine niedrige Hybridisierungstemperatur verstärkt auch unspezifische Bindungen, so daß hybridisierende Banden durch den Hintergrund verdeckt werden; die Bestimmung schwacher Banden wird dadurch schwierig.

Einen direkten Vergleich der Ergebnisse bei beiden Hybridisierungstemperaturen zeigt Abb. 12. Wie bei der Aufnahme von Schmelzkurven wurde Antirrhinum-DNS eingesetzt, um festzustellen, ob Hybridisierung und Hybridisierungsstärke von Insert-DNS aus pLF 56 bzw. pBR 322-DNS durch das Vorliegen einer heterologen DNS-Probe bedingt sind, oder ob es sich um "Matthiola-spezifische" Ergebnisse handelt. Bei keiner der untersuchten Pflanzenarten (Matthiola, Antirrhinum und Petersilie) ergibt sich im Falle des Abbaus mit Eco RI ein Unterschied bei Hybri-

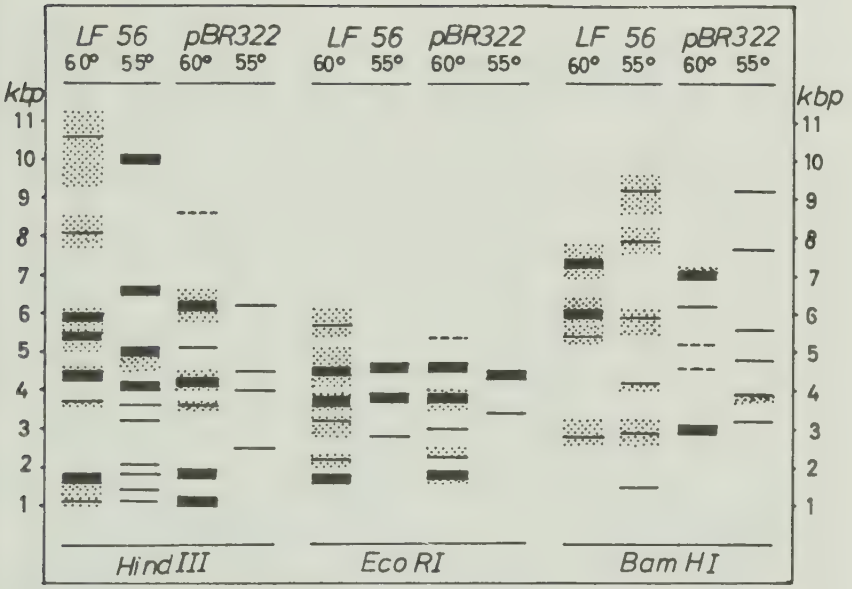


Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Southern-Hybridisierungen von Matthiola-DNS mit ^{32}P-pLF 56-Insert-DNS und pBR 322-DNS unter Hybridisierungsbedingungen II (60°C) und III (55°C *).
Die Ergebnisse von Hybridisierungen der Matthiola-Linien 04, 17 und 18 wurden zusammengefaßt. Die Punktierung gibt den Schwankungsbereich bei der Größenbestimmung an, die Stärke des Balkens die Intensität des Hybridisierungssignals. Die Werte für die Hybridisierung bei 60°C sind aus Abb. 6 übernommen.

*Dem Medium waren 5,3% Formamid zugesetzt; dies entspricht umgerechnet einer Inkubationstemperatur von 58,5°C.

disierung unter Bedingungen II oder III. Auch Zusatz von Poly-(C)zum Hybridisierungsmedium hat keinen Einfluß auf das Ergebnis.
Die Zusammenfassung verschiedener Hybridisierungsergebnisse unter Hybridisierungsbedingungen III (die im einzelnen nicht im Bild dargestellt sind) gibt Abb. 13. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Hybridisierung bei 60°C stammen die Muster aus wenigen Versuchen (beim Hind III-Abbau und beim Eco RI-Abbau aus je zwei, beim Bam HI-Abbau aus sechs <Insert-DNS> bzw. zwei Ansätzen <pBR 322>), so daß bei schwach erscheinenden Banden Aussagen schwer möglich sind. Vergleich mit den Ergebnissen der Hybridisierung bei 60°C zeigt, daß keine starke Reaktion mit zuvor noch nicht aufgetretenen Matthiola-DNS-Banden auftritt. Die deutliche Bande von 10 kbp-Größe des Hind III-Abbaus liegt im Bereich unvollständig abgebauter DNS und muß, da sie keine Entsprechung bei den anderen Abbauten hat, als Reaktion nicht völlig geschnittener DNS gedeutet werden; diese Reaktion tritt schwächer auch bei Hybridisierung bei 60°C auf. Die nach Abbau mit Bam HI und Hybridisierung mit Insert aus pLF 56 neu erkennbare Banden finden jeweils ihre Entsprechung in von pBR 322 markierten DNS-Stücken.
Durch Absenken der Hybridisierungstemperatur von 60°C (Hybridisierungsbedingungen II) auf (umgerechnet) 58,5°C (Hybridisierungsbedingungen III) kann also weder die Hybridisierungsantwort von CHS-spezifischen Sequenzen der Matthiola-DNS verstärkt werden, noch kann verhindert werden, daß zu pBR 322-DNS homologe DNS-Abschnitte Kreuzhybridisierungssignale geben.

3.1.7. Vergleich der Hybridisierungsantwort von Matthiola- und Antirrhinum-DNS bei Hybridisierung mit pBR 322- bzw. pLF 56-Insert-DNS

Die Schmelzkurven der Hybride aus pLF 56-Insert-DNS mit Matthiola- oder Antirrhinum-DNS unterscheiden sich nicht offensichtlich. Bei Antirrhinum konnten aber unter den hier verwendeten Bedingungen (Hybridisierungsbedingungen II) Teile der genomischen CHS-Sequenz identifiziert werden (Wienand et al.,

1982; Saedler et al., 1982). Die Frage ist deshalb, wie sich die DNS der beiden Pflanzen im direkten Vergleich bei Hybridisierung nach Restriktionsabbau und Gelelektrophorese verhalten.

Die Größe der Eco RI-Fragmente, die mit pLF 56-Insert-DNS hybridisieren, stimmt bei Petersilie, Antirrhinum und Matthiola erstaunlich gut überein (Abb. 12, 14). Antirrhinum- und Petersilien-DNS zeigen aber ein deutlich stärkeres Signal als Matthiola-DNS. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die auf dem Gel aufgetragene Menge an Petersilien-DNS geringer ist als die der beiden anderen Pflanzen (Abb. 12, 14), und daß die Antirrhinum-DNS in Abb. 12 unvollständig geschnitten ist, so daß sich ihre Hybridisierung auf mehrere Banden verteilt.

Anders ist die Situation, wenn zur Hybridisierung radioaktiv markierte pBR 322-DNS eingesetzt wird (Abb. 15). Unvollständig mit Eco RI abgebaute Antirrhinum-DNS, die in ihrer Größenverteilung mit der in Abb. 12 zu vergleichen ist und hier bei Hybridisierung mit Insert-DNS deutliche Banden ergab, zeigt jetzt als Hybridisierungsantwort nur eine unspezifische Reaktion (Abb. 15, Bahnen 3, 4). Dagegen werden bei Matthiola-DNS eindeutig Banden sichtbar (Abb. 15, Bahnen 1, 2). Weitere Versuche, Restriktionsabbauten von Antirrhinum-DNS mit pBR 322-DNS zu hybridisieren, ergaben keine den Ergebnissen mit Matthiola-DNS vergleichbaren Resultate.

Antirrhinum-DNS zeigt also einerseits mit pLF 56-Insert-DNS eine stärkere Reaktion als Matthiola-DNS, andererseits ist die bei Aufnahme der Schmelzkurven auch bei Antirrhinum-DNS gefundene Bindung von reiner pBR 322-DNS wohl eine allgemeine DNS-DNS-Wechselwirkung, die sich in Abb. 15 in einem Nachzeichnen der DNS-Mengen in einer Gelbahn äußert. Die Hybridisierungssignale von Antirrhinum-DNS mit Insert-DNS aus pLF 56 scheinen also auf der Reaktion von CHS-Sequenzen zu beruhen. Matthiola-DNS bindet dagegen pBR 322-DNS stark und in definierten Mustern; die Reaktion der CHS-Sequenz von Matthiola mit Insert-DNS wird nicht deutlich.

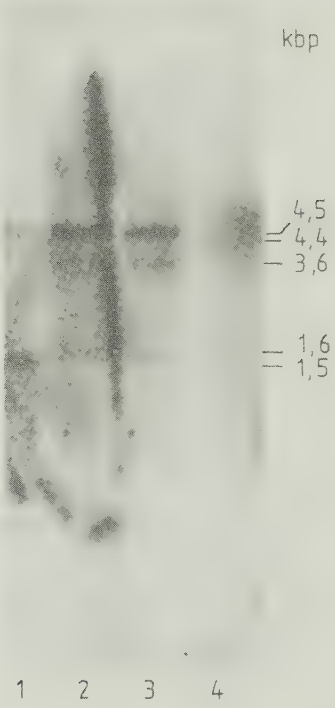


Abbildung 14: Southern-Hybridisierung von Eco RI-abgebauter Pflanzen-DNS mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS unter Hybridisierungsbedingungen II (Exposition 68 h mit Verstärkerfolie).
1 Petersilien-DNS (Blätter), ca. 2 µg;
2 Antirrhinum-DNS aus Linie 4 (Sprosse), 5 µg;
3 Antirrhinum-DNS aus Linie 1 (Sprosse), 5 µg;
4 Matthiola-DNS aus Linie 04 (Sprosse), 5 µg.

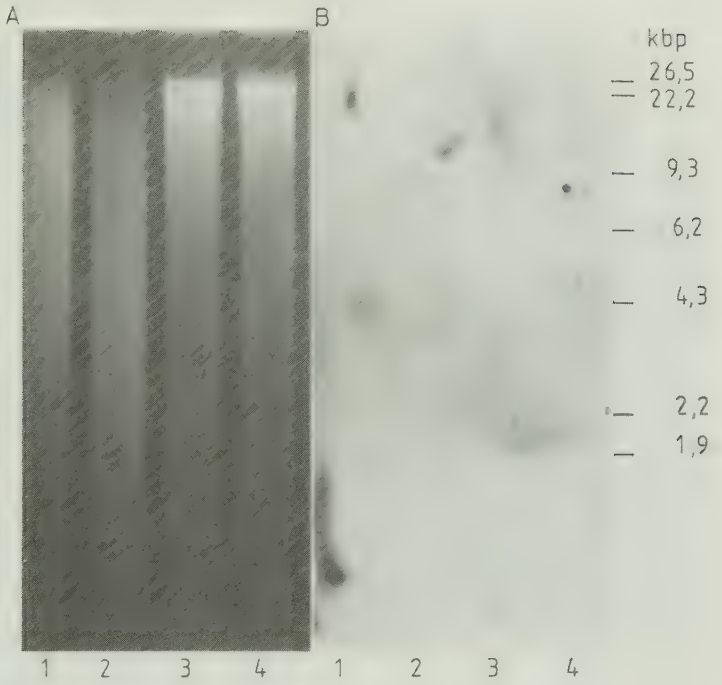


Abbildung 15: Southern-Hybridisierung von Eco RI-abgebauter Pflanzen-DNS mit ^{32}P-markierter pBR 322-DNS.
A EtBr-gefärbtes Gel;
B Autoradiografie (Exposition 65 h mit Verstärkerfolie).
1 Matthiola-DNS, Linie 04 (Blüten), 5 µg;
2 Matthiola-DNS, Linie 18 (Blüten), 5 µg;
3 Antirrhinum-DNS, Linie 4 (Sprosse), 5 µg;
4 Antirrhinum-DNS, Linie 1 (Sprosse), 5 µg.

3.1.8. Versuche zur Entfernung von pBR 322-Sequenzen aus dem Hybridisierungsansatz

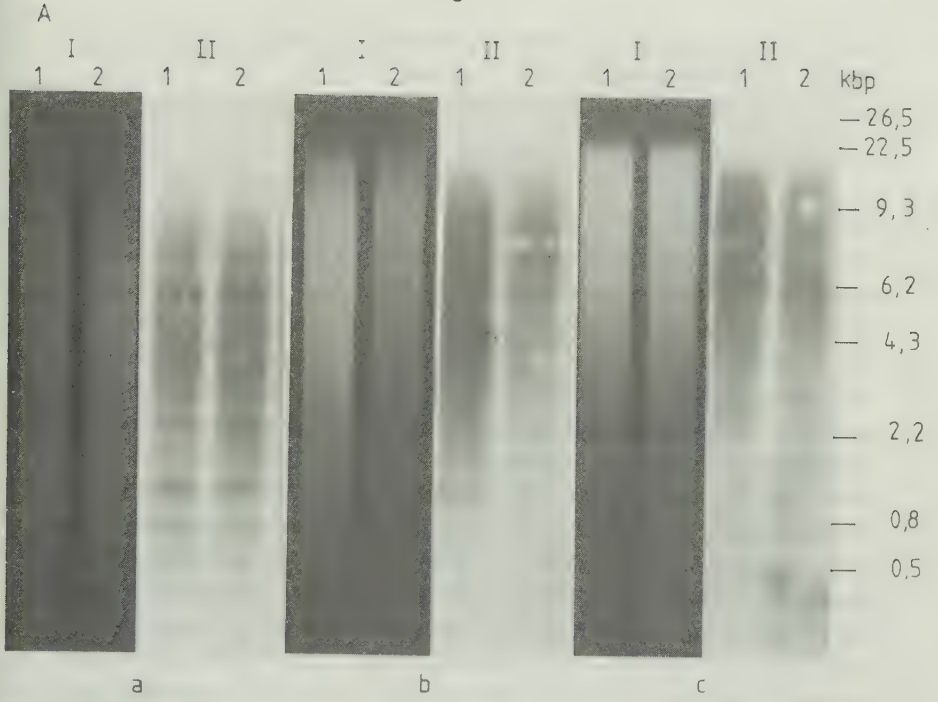
Die Hybridisierung von pBR 322-Sequenzen mit komplementären Abschnitten der Matthiola-DNS muß verhindert werden, wenn eine Aussage über ihre CHS-codierenden Sequenzen möglich werden soll. Das kann theoretisch erfolgen:

- durch Zusatz eines Überschusses unmarkierter pBR 322-DNS in Hybridisierungs- und Vorhybridisierungsmedium,
- durch Abfangen der radioaktiv markierten pBR 322-DNS durch filtergebundenes Plasmid pBR 322,
- durch Umklonieren der Insert-Sequenz von pLF 56 in einen nicht kreuzhybridisierenden Vektor.

Die ersten beiden Möglichkeiten wurden getestet. Bei der Aufnahme der Schmelzkurven wurden Vorhybridisierungs- und Hybridisierungsmedium je 10 µg/ml pBR 322-DNS zugesetzt. Bei einem Hybridisierungsansatz von 5 ml und 0,5 µg markierter DNS entspricht das einem 100fachen Überschuß der unmarkierten DNS. Trotzdem wurde von Matthiola- und Antirrhinum-DNS Radioaktivität gebunden, wenn pBR 322 als ^{32}P-markierte Probe eingesetzt wurde. In diesem Fall war die gebundene Radioaktivität sogar höher als bei Verwendung von markierter Insert-DNS (Tab. 2). Mit diesem Ansatz gelingt es also nicht, pBR 322-Hybridisierung auszuschließen.

Filtergebundene pBR 322-DNS (20 x 0,1 µg) und E. coli-DNS mit pBR 322-Anteil (20 x 5 µg) wurde bei zwei aufeinanderfolgenden Inkubationen unter Hybridisierungsbedingungen III mit Insert-DNS hybridisiert. Der zweite Ansatz zeigte einen Abfall der Menge gebundener Radioaktivität (um ca. 30%). Trotz dieser Vorinkubation der ^{32}P-markierten Probe bildete die daraufhin hybridisierte Matthiola-DNS typische, bei Hybridisierung mit pBR 322 auftretende Banden aus, und auch die pBR-322-Bande des als Hybridisierungsstandard eingesetzten, Pst I-geschnittenen pLF 56 leuchtete auf. Das heißt, daß auch auf diese Weise die Hybridisierung von pBR 322-DNS nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine Umklonierung der CHS-spezifischen Sequenz des Klones pLF 56 in den Vektor M 13 wird gerade von Dr. F. Kreuzaler



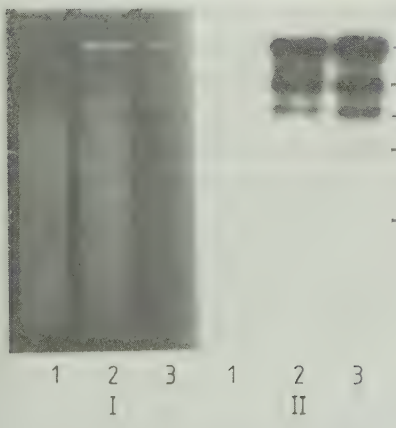


Abbildung 16: Vergleich der im EtBr-gefärbten Gel sichtbaren Banden repetitiver DNS mit den Hybridisierungsmustern, die mit ^{32}P-markierter pLF 12-Insert-DNS erhalten werden.
A Autoradiografie (II) und Gelbild (I) von Matthiola-DNS;
a Hind III-Abbau;
b Eco RI-Abbau;
c Bam HI-Abbau;
1 Blüten-DNS, Linie 04, 5 µg;
2 Blüten-DNS, Linie 18, 5 µg.
B Autoradiografie (II) und Gelbild (I) von
1 λ-DNS, Hind III, 1 µg;
2 λ-DNS, Hind III, 1 µg, und Kalbsthymus-DNS, Ultraschall-behandelt, 1 µg;
3 Kalbsthymus-DNS, Ultraschall-behandelt, 1 µg.

unternommen, und der entstehende Klon soll für weitere Versuche zur Verfügung gestellt werden.

3.1.9. Mengeneffekte bei der Hybridisierung

Da bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert- und pBR 322-DNS unter Hybridisierungsbedingungen II auch die als Größenmarker eingesetzte Lambda-DNS reagiert (Abb. 4), und die auftretende Bindung eindeutig nur die DNS-Mengenverhältnisse in einer Gelbahn widerspiegelt - z.B. auch im Fall einer Mischung aus Kalbs- und Lambda-DNS (Abb. 16B) -, muß die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die bei Hybridisierung von Pflanzen-DNS auftretenden Bandenmuster nur die Verteilung repetitiver DNS nachzeichnen. Abb. 16 zeigt, daß sich einige Banden repetitiver DNS, die im niedermolekularen Bereich liegen, mit bei Hybridisierungen auftretenden Banden in Übereinstimmung bringen lassen, jedoch leuchten nicht alle im Gelbild sichtbaren Banden bei Hybridisierung auf. Für die typischen Hybridisierungsmuster, etwa für das der Eco RI-abgebauten DNS, läßt sich zwar nicht eindeutig sagen, daß sich im Bereich der aufleuchtenden Banden keine repetitiven Sequenzen befinden, da sie über alle Größenbereiche der DNS verteilt zu finden sind, offensichtlich wird aber nicht die mengenmäßige Verteilung der DNS in der Gelbahn wiedergegeben.
Durch die Hybridisierung werden also spezifische, wenn bei Matthiola-DNS auch vor allem zu pBR 322-DNS homologe, Sequenzen erkannt.

3.2. Klonierung von Matthiola-DNS

3.2.1. Klonierung im Plasmid pBR 325

Für die Klonierung von Pflanzen-DNS werden Transformationsausbeuten beschrieben, die zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger liegen können als die mit tierischer DNS erhaltenen (Panopoulos, 1982). Bei Tieren liegen typische Ausbeuten bei rund 2×10^4 Klonen pro µg Vektor-DNS, die zur In-vitro-Ligation eingesetzt wird. Der Grund für die geringe Klonierungseffizienz von Pflan-

zen-DNS wird im Anteil von Kohlenhydraten und Fetten in den DNS-Präparationen gesehen; zur Klonierung muß deshalb hochgereinigte DNS eingesetzt werden. Diese Reinigung wird durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation erreicht.

Zunächst wurde die Klonierungseffizienz der Matthiola-DNS bestimmt. CsCl-Actinomycin D-Gradienten-gereinigte DNS aus Matthiola-Blüten wurde zur Ligation mit dem Plasmid pBR 325 über Hind III-Schnittstellen eingesetzt. DNS-Einbau in die Hind III-Schneidestelle des Plasmids pBR 325 führt zur Zerstörung des Tetracyclin-Resistenzgens des Plasmids. Die Plasmid-DNS war mit alkalischer Phosphatase behandelt, um Selbstligation auszuschließen; dennoch wurde ein hoher Anteil ursprünglicher Plasmidmoleküle durch Test der Antibiotica-Resistenzen der Bakterien bestimmt. Dies kann durch unzureichende Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase oder durch im Ligationsansatz vorhandenes, im Agarosegel jedoch nicht feststellbares, ungeschnittenes Plasmid hervorgerufen werden. Zusätzlich weisen auch von den 209 im Test auf Antibiotika-Resistenzen als "rekombinant" eingestuften Plasmiden nur 104 sicher fremde inserierte DNS auf. Die restliche Hälfte der Klone muß ihre Tetracyclin-Resistenz zwar während der Klonierung, aber nicht auf Grund von DNS-Insertion verloren haben.
In drei verschiedenen Transformationen wurden mit Ligationsansätzen von Matthiola-DNS der Linien 04 und 06 und pBR 325-DNS 132 bzw. 77 Bakterienklone erhalten (Tab. 3). Das entspricht 19 bzw. 11 Klonen pro µg Vektor-DNS. Diese Ausbeute läßt eine Klonierung der gesamten DNS-Sequenz des Matthiola-Genoms im Plasmid-System unmöglich erscheinen. Hinzu kommt, daß die Grösse der im Plasmid integrierten Pflanzen-DNS gering ist: mehr als die Hälfte der Insertionen ist kleiner als 1,5 kbp (Abb. 20). Bei Hybridisierung mit pLF 56 gab keine Insert-DNS-Sequenz ein Signal.
Der Weg der Klonierung des CHS-Gens im Plasmid-System erscheint deshalb nur gangbar, wenn die DNS-Abschnitte, die seine Sequenz enthalten, vorselektioniert werden können.
Da das mit Eco RI linearisierte Plasmid pLF 56 bei Southern-Hybridisierung Hind III-abgebauter Matthiola-DNS Fragmente der Größen 6,1 und 12,1 kbp aufleuchten ließ, das Plasmid pLF 56

Tabelle 3: Klonierung im Plasmid-System. Ausbeuten rekombinanter Plasmide.

Matthiola-DNS Linie	Art	Menge 2) µg	Vektor-DNS Menge µg	Transform. Ansatz Nr.	Rekombinante Klone	Ligationsgrad 1) %
04	gesamt	5	2	I	19	76
04	gesamt	7,5	2,5	II	17	41
04	gesamt	7,5	2,5	III	96	31
06	gesamt	5	2	I	10	27
06	gesamt	7,5	2,5	II	9	36
06	gesamt	7,5	2,5	III	58	29
Summen:		40	14		209	
04	Frkt.B	1,05	0,75	IV	2700	ca.30
		1,05	0,75	V	1400	ca.30
04	Frkt.A	2,75	0,75	IV	880	ca.30
		2,75	0,75	V	1000	ca.30
06	Frkt.C	0,6	0,75	IV	200	ca.30
		0,6	0,75	V	10000	ca.30
06	Frkt.D	1,15	0,75	IV	2000	ca.30
		1,15	0,75	V	1400	ca.30
04	Frkt.E	0,5	0,75	IV	5400	ca.30
		0,5	0,75	V	4000	ca.30
04	Frkt.F	0,25	0,75	IV	20000	ca.30
		0,25	0,75	V	20000	ca.30
04	Frkt.G	0,25	0,75	IV	10000	ca.30
		0,25	0,75	V	6000	ca.30
04	Frkt.H	2,1	0,75	IV	480	ca.30
		2,1	0,75	V	600	ca.30
04	Frkt.I	1,75	0,75	IV	15000	ca.30
		1,75	0,75	V	5400	ca.30
Summen:		18,7	6,75		106460	

1) Ligationsgrad = Anteil der durch In-vitro-Ligation veränderte Plasmide enthaltenden Bakterienklone verglichen mit der Zahl erhaltener Transformanten; Bestimmung durch Test der Antibioticaresistenzen

2) DNS-Menge aus den Gradientenfraktionen abgeschätzt aus dem OD_{260}-Verlauf der Gradienten

Transformanten-Ausbeuten pro µg Plasmid pBR 325 (Transformationskontrolle):
Ansatz Nr. I: $1,1 \times 10^6$
Ansatz Nr. II: $1,5 \times 10^6$
Ansatz Nr. III: $1,9 \times 10^6$
Ansatz Nr. IV: $2,2 \times 10^6$
Ansatz Nr. V: $2,0 \times 10^6$

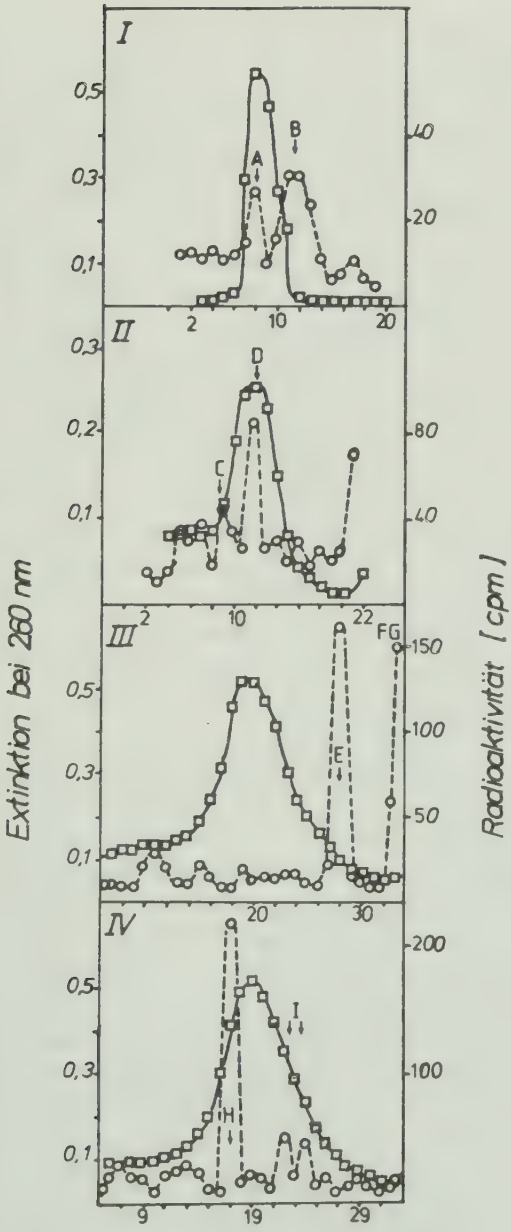


Abbildung 17: Saccharosegradientenzentrifugation und Hybridisierung von Hind III-abgebauter Matthiola-DNS.
300 µg (I und II) bzw. 500 µg (III und IV) vollständig abgebauter DNS wurde auf einem linearen Saccharosegradienten aufgetrennt (2.3.5.2.).
Ein Aliquot jeder Fraktion wurde entnommen (I,II je 150 µl, III, IV je 75 µl), und die enthaltene DNS denaturiert und auf Nitrozellulose fixiert (2.3.3.2.).
Danach wurde unter Hybridisierungsbedingungen I bzw. Ia mit linearisierter pLF 56-DNS inkubiert (2.5.2.1.).
I Matthiola-DNS, Linie 04 (Blüten), DNS über Actinomycin D-CsCl-Gradienten gereinigt;
II Matthiola-DNS, Linie 06 (Blüten);
III und IV Matthiola-DNS, Linie 04 (Blüten).

also scheinbar zur Markierung der CHS-Gensequenz in Matthiola-DNS eingesetzt werden konnte (Abb. 3), bot sich folgendes Vorgehen an: Mit dem Restriktionsenzym Hind III abgebaute Matthiola-DNS wurde durch Zentrifugation auf einem Saccharosegradienten in verschiedene Größenklassen aufgetrennt. Durch Hybridisierung eines Aliquots der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen DNS mit ^{32}P-markiertem, mit Eco RI linearisiertem Plasmid pLF 56 wurde versucht, CHS-Gensequenzen enthaltende Fraktionen zu identifizieren. Hybridisierungsantwort gebende Größenklassen wurden zur Klonierung eingesetzt. In vier Gradienten ergaben drei Größenklassen eine Hybridisierungsreaktion (Abb. 17): eine mit DNS-Fragmenten größer als 12 kbp (Fraktionen E, F und G), eine mit rund 7,5 kbp (Fraktionen B und I) und schließlich eine mit 1,5-3,5 kbp (Fraktionen A, C, D und H). Die unterschiedliche Verteilung der Hybridisierungsantwort über die verschiedenen Gradienten kann auf unterschiedlichen Abbau der DNS in den Ansätzen oder auf Hybridisierungsartefakte zurückzuführen sein. Die in einer Gradientenfraktion enthaltene DNS macht maximal 28%, minimal 2% der gesamten DNS-Menge aus. Damit wird durch dieses Verfahren theoretisch eine Anreicherung einer bestimmten Sequenz um den Faktor 3,6-50 erreicht.
Nach Ligation der DNS aus diesen Fraktionen mit pBR 325 über Hind III-Schnittstellen wurden insgesamt rund 100 000 echte Bakterienklone erhalten (Tab. 3). In Stichproben wurde der Anteil unveränderter Klonierungsplasmide durch die vermittelten Antibiotika-Resistenzen getestet; der Anteil Tetracyclin-resistenter Bakterien im Transformationsansatz betrug, unabhängig von der zur Ligation eingesetzten Matthiola-DNS-Probe, 70%. Dieser Anteil Ursprungsplasmid wurde bei der Bestimmung der Bakterienklon-Zahl von 10^5 eingerechnet.
Eine Auswahl zufällig präparierter Plasmide, die den Bakterienklonen im Test keine Tetracyclin-Resistenz vermitteln konnten, zeigte, ähnlich wie oben beschrieben, nur in rund 50% der Fälle eine Integration von Matthiola-DNS. Damit blieben ca. 50 000 Bakterienklone, die wirklich rekombinante Plasmide trugen.
Sie wurden in Mikrotiterplatten so angezogen, daß durchschnittlich zehn unabhängige Klone pro Mikrotiterstelle vorhanden

waren. Nach der Methode von Grunstein (1975) wurde ihre DNS auf Nitrozellulose übertragen und mit pLF 56-Insert-DNS hybridisiert. Der Bakterienklon LF 56 diente dabei als Positivkontrolle (vgl. Abb. 18). 25 Klonfamilien erwiesen sich als verdächtig, CHS-Sequenzen zu enthalten. Sie wurden angezogen und aus ihnen Plasmid-DNS isoliert, diese mit Hind III abgebaut und nach Elektrophorese und Southern-Transfer mit pLF 56-Insert-DNS hybridisiert (Abb. 19). Dasselbe wurde mit Einzelkolonien durchgeführt, die aus dem Bakteriengemisch angezogen worden waren. Auch die verdächtigen Bakterien selbst wurden nochmals einer Koloniehybridisierung unterzogen, um auszuschließen, daß bei der Vereinzelung ein Bakterienklon verloren ging.
Unter den untersuchten Klonen befand sich keiner, der CHS-Sequenzen im Plasmid integriert hatte.
Die Ausbeute an rekombinanten Plasmiden ist, wenn zur Ligation DNS aus Saccharosegradienten-Fraktionen eingesetzt wird, rund tausend Mal höher, als wenn Gesamt-DNS zur Ligation benutzt wird (Tab. 3). Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, daß die Pflanzen-DNS durch den Saccharosegradienten einer weiteren Reinigung unterzogen wurde. Die Ausbeuten sind aber auch unter den einzelnen Fraktionen des Gradienten verschieden (10^3 bzw. 4×10^4 Klone pro 1,5 µg Vektor-DNS).
Die DNS in den Saccharosegradienten-Fraktionen unterscheidet sich in zweifacher Weise: in ihrer Menge und in ihrer durchschnittlichen Größe. Es scheint, daß vor allem das dadurch erzielte abweichende Verhältnis von Matthiola- und Vektor-DNS in der Ligation Einfluß auf die Ausbeute rekombinanter Plasmide hat. Bei dem Ligationsansatz mit der höchsten Ausbeute lag das Verhältnis bei 0,3.
Ein Phänomen bei der Klonierung der Matthiola-Gesamt-DNS war das Dominieren von kleinen Fremd-DNS-Stücken im rekombinanten Plasmid. Dies kann durch bevorzugte Ligation kleiner Fragmente aus dem Gesamtangebot an DNS-Stücken oder durch Kleinschneiden der integrierten Pflanzen-DNS im Bakterium erklärt werden. Beim Einsatz der DNS aus den Gradienten-Fraktionen, die wenige kleine Stücke enthalten, verschiebt sich die Größenverteilung der Insert-DNS. Rund 50% der zufällig ausgesuchten Plasmide tragen

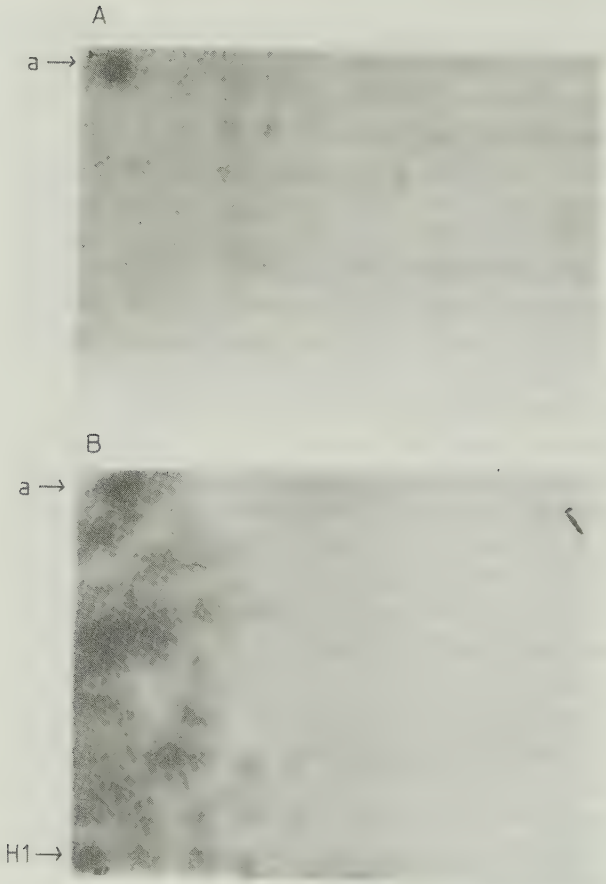


Abbildung 18: Koloniehybridisierung rekombinanter Bakterienklone mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS.
Die Bakterienklone wurden in Mikrotiterplatten angezogen und nach der Methode von Grunstein (1975) auf Nitrozellulose übertragen. Die Hybridisierung wurde unter Hybridisierungsbedingungen Ia bei 55°C ausgeführt.
A Beispiel einer Hybridisierung ohne Hybridisierungssignal der rekombinanten Klone;
B Beispiel einer Hybridisierung mit einem Hybridisierungssignal der "Familie" rekombinanter Klone H 1.
a ⟶ pLF 56

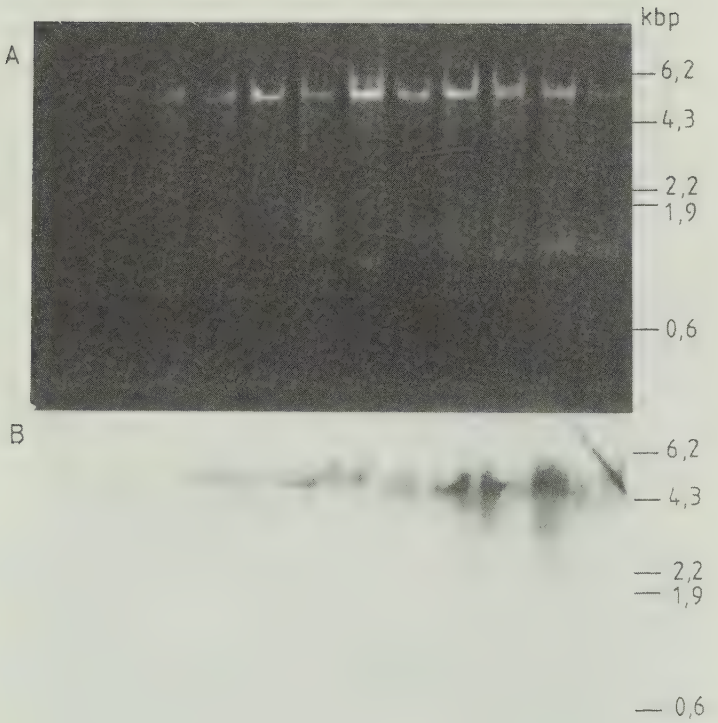


Abbildung 19: Hybridisierung Hind III-abgebauter rekombinanter Plasmide mit ^{32}P-markierter pLF 56-Insert-DNS.
Plasmid-DNS aus Klonen, die bei Koloniehybridisierung eine Hybridisierungsantwort gegeben haben, wurde im "Miniscreen"-Verfahren (2.2.2.1.) isoliert; die Plasmid-DNS wurde mit Hind III geschnitten, auf Agarose elektrophoretisch aufgetrennt und nach Southern auf Nitrozellulose transferiert. Die Hybridisierung wurde unter Hybridisierungsbedingungen Ia bei 55°C ausgeführt (Expositionsdauer 4 Tage).
Die Hybridisierung der pBR 325-DNS-Banden (ungeschnittene, multimere und lineare Plasmid-Form) kommt durch Reste des Klonierungsplasmids pBR 322 in der pLF 56-Insert-DNS-Präparation zustande.
A EtBr-gefärbtes Agarosegel;
B Autoradiografie des Nitrozellulosefilters.

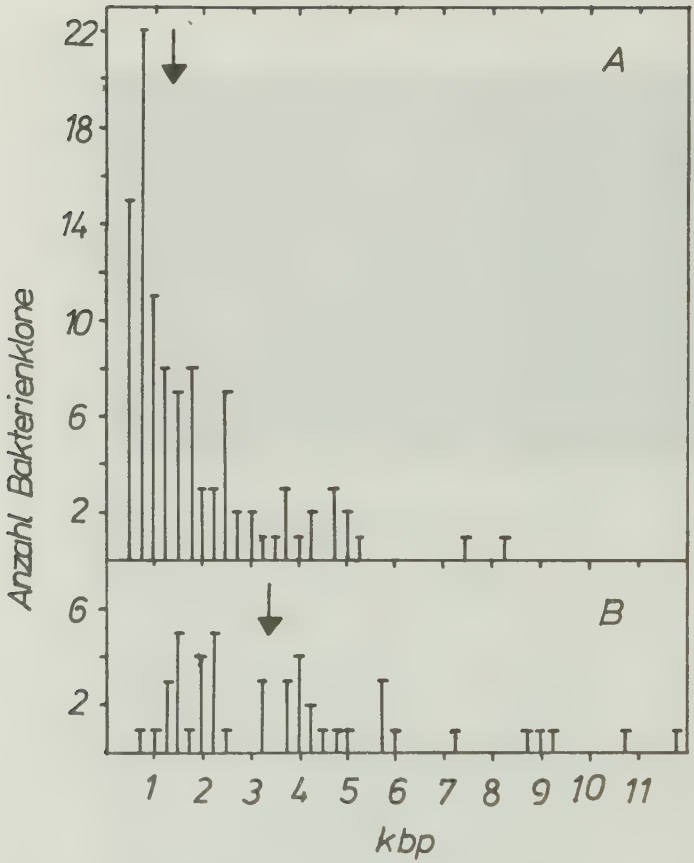


Abbildung 20: Größenverteilung der in pBR 325 integrierten Matthiola-DNS.

A Zur Ligation mit Hind III-geschnittenem Plasmid pBR 325 wurde vollständig mit Hind III geschnittene Matthiola-DNS, Linie 04 (Blüten) eingesetzt (104 untersuchte Klone).

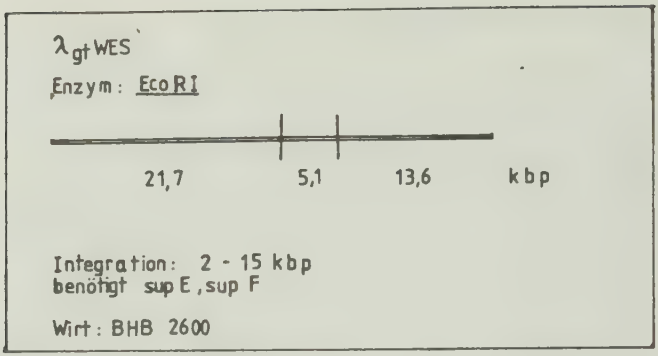
B Zur Ligation mit Hind III-geschnittenem Plasmid pBR 325 wurde über Saccharosegradienten-Zentrifugation in Größenklassen unterteilte Matthiola-DNS, Linie 04 (Blüten), eingesetzt (46 untersuchte Klone).

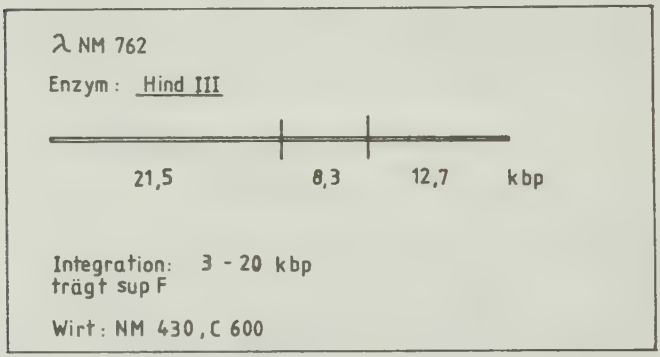
Der Pfeil gibt die Größe inserierter Matthiola-DNS an, die von 50% der untersuchten Insert-Sequenzen unterschritten wird. Die Einteilung erfolgte in Schritten à 250 bp.

jetzt Insertionen, die größer als 3 kbp sind (Abb. 20). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß das Vorherrschen kleiner DNS-Insert-Sequenzen bei Ligation von Gesamt-DNS ins Plasmid auf der bevorzugten Ligation dieser Sequenzen beruht.
Die erzielten Ausbeuten rekombinanter DNS-Moleküle und die Größenverteilung der integrierten Pflanzen-DNS zeigen, daß, wenn eine eindeutige Selektion einer DNS-Sequenz des Matthiola-Genoms aus dem Saccharosegradienten möglich wäre, diese auch im Plasmid-System zu klonieren wäre.
Da jedoch mit pLF 56- bzw. pLF 12-Sequenzen keine Identifizierung der CHS-Gensequenzen von Matthiola möglich war (vgl. 3.1.), ist die Isolierung dieser Sequenz nur über die Bildung einer Matthiola-DNS-Bibliothek möglich. Diese sollte durch Klonierung im Phagen-System erstellt werden.

3.2.2. Klonierung in Phagenvektoren

Bakteriophagen λ-DNS besitzt Abschnitte, die nicht essentiell für die Vermehrung des Phagen sind. Unbedingt notwendig für die Reifung von Phagenpartikeln sind die Strukturgene des Phagen (z.B. die Gene E, D, W und S), die DNS-Größe (minimal 75%, maximal 105% des Wildtyp-Phagengenoms) und das Vorliegen der kohäsiven Phagen-DNS-Enden (cos-Enden) <Bellet et al., 1971; Hohn et al., 1977>. Bleiben diese Eigenschaften erhalten, kann in vitro fremde DNS integriert und die entstandene DNS-Sequenz als Genom eines rekombinanten Phagen vermehrt werden. Die gebildeten Phagen können keinen lysogenen Zyklus ausführen, weil die zugrunde liegenden Klonierungsphagen Deletionen im Bereich des cI-Repressor-Gens tragen.
Effektive Klonierung von DNS wird mit zwei Klonierungsphagen-Typen erreicht: den Insertionsphagen und den Replacementphagen. Insertionsphagen (z.B. λ NM 1150; Murray et al., 1977 und pers. Mitteilung) enthalten eine, Replacementphagen (z.B. λgtWES; Sternberg et al., 1977) zwei Schneidestellen für das zur Klonierung benutzte Restriktionsenzym. Restriktionsabbau von Replacementphagen liefert ein mittleres DNS-Fragment und zwei Phagenarm-DNS-Fragmente (Abb. 21). Die Phagenarm-DNS trägt die gesamte zur Phagenvermehrung notwendige Information; das Mittelfragment kann beliebig ersetzt werden. Da die Verbindung zweier Armfragmente DNS liefert, die zu klein ist, um verpackt zu werden, können bei Replacementphagen nur neue, in vitro gebildete Ligationsprodukte aus Phagenarmen und mittleren DNS-Stücken in Phagenpartikel verpackt werden. Bei Insertionsphagen ist diese Art der Selektion durch die Verpackung der DNS nicht möglich; Selektion rekombinanter Phagen muß hier durch andere Systeme, etwa durch unterschiedliche Wirtsbereiche von





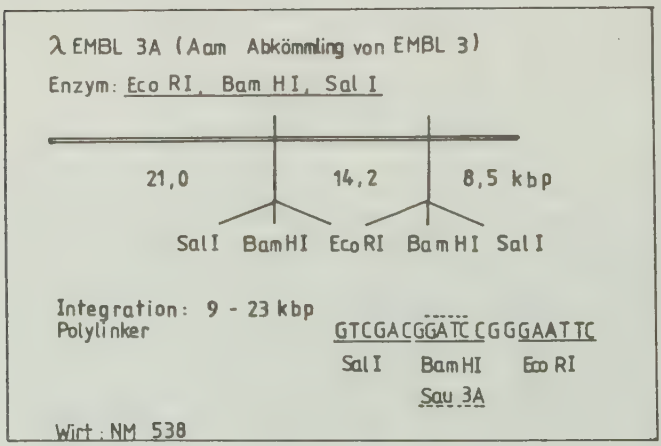


Abbildung 21: Restriktionskarten und Eigenschaften der benutzten Replacement-Klonierungsphagen λgtWES, λNM 762 und λEMBL 3A.

Klonierungsphage und rekombinantem Phagen, erreicht werden. Am häufigsten werden Replacementphagen zur Klonierung benutzt (z.B. Blattner et al., 1978; Maniatis et al., 1978). Sollen DNS-Sequenzen kloniert werden, die innerhalb der zur Klonierung benutzten Fremd-DNS einen hohen Anteil ausmachen (z.B. rDNS) kann Selbstligation (Ligation der Phagenarm-Fragmente mit dem Phagen-DNS-Mittelfragment) der Vehikel-DNS in Kauf genommen werden, wenn Ausgangsphage und neu gebildeter Phage unterscheidbar sind. Dies wird im Falle des Phagen λNM 762 dadurch erreicht, daß sein DNS-Mittelfragment das supF-Gen von E. coli trägt. Nur wenn dieses Gen vorhanden ist, können infizierte Indikatorbakterien (NM 430, lacZam) Lactose verwerten.
Ein Klonierungsphage ist um so besser zur Herstellung einer Bibliothek der gesamten DNS eines Organismus geeignet, je grösser die DNS-Fragmente sind, die er aufnehmen kann. Die bei Restriktionsverdau der DNS eines Eukaryonten entstehenden Fragmente nehmen einen weiten Größenbereich ein. Ihre mittlere Größe liegt bei einem Enzym, das 6 bp erkennt, bei 3-6 kbp. Bei vollständigem Abbau wäre damit eine große Zahl von Fragmenten von der Klonierung in Phagen-Vektoren ausgeschlossen. Deshalb, und auch zur Steigerung der Größe integrierter DNS, wird die zu klonierende DNS partiell abgebaut, wenn möglich mit Restriktionsenzymen, die 4 bp als Erkennungssequenz besitzen. Ein kompatibles System von Restriktionsenzymen mit 6 bp-Erkennungssequenz und 4 bp-Erkennungssequenz bilden die Enzyme Bam HI (6 bp) und Sau 3A (4 bp); über die Bam HI-Schneidestellen des Phagen λEMBL 3A ist Klonierung von DNS möglich, die partiell mit Sau 3A verdaut wurde.

Die Klonierung von DNS im Phagen-System umfaßt folgende Schritte:

- Anzucht der Klonierungsphagen und Reinigung der Phagen-DNS (3.2.2.1.1.).
- Vorbereitung der Phagen-DNS zur Ligation. Neben dem Abbau der DNS mit Restriktionsenzymen müssen auch Methoden angewendet werden, die eine Rekonstitution des Klonierungsphagen ausschließen (3.2.2.1.2.).
- In-vitro-Ligation von Phagen-DNS mit fremder DNS (3.2.2.1.3.).
- Vermehrung der in vitro ligierten DNS in E. coli-Zellen (3.2.2.1.4.). Dies kann durch Transformation oder nach In vitro-Verpackung der Phagen-DNS und anschließender Phageninfektion von E. coli erfolgen. Die Effizienz von 10^7-10^8 pfu/µg (Klonierungs-)Phagen-DNS bei In vitro-Verpackung gegenüber 10^4-10^6 pfu/µg (Klonierungs-)Phagen-DNS bei Transfektion zeigt, daß ersteres Verfahren zu bevorzugen ist (Murray et al., 1977; Sternberg et al., 1977; Hohn et al., 1977; Hohn, 1979).

3.2.2.1. In-vitro-Reaktionen zur Bildung rekombinanter Phagen

3.2.2.1.1. Anzucht von Klonierungsphagen und Reinigung der Phagen-DNS

Die Anzucht von Phagen kann in Flüssigkultur oder über Agarplatten erfolgen. Bei Phagenvermehrung über festes Medium bleiben bei allen folgenden Präparationsschritten oft Agarreste vorhanden, die dann die Enzymreaktionen (Restriktionsabbau, Ligation, Verpackung) stören (Ergebnis nicht dargestellt). Diese Art der Vermehrung wird deshalb nur bei Phagen angewandt, die trübe Plaques ausbilden (z.B. λNM 1150). Lyse der Indikatorbakterien tritt bei Anzucht im Flüssigmedium nicht so sicher ein wie bei Anzucht auf Agarplatten. Kritische Punkte bilden hier die "multiplicity of infection (moi)", der Zustand der Indikatorbakterien zum Zeitpunkt des Animpfens und das benutzte Kulturmedium. Bei allen eingesetzten Klonierungsphagen (λgtWES, λNM 762, λ EMBL 2A) trat Lyse nur ein, wenn die moi größer als 1 war.

Die Indikatorbakterien begünstigen die Phagenvermehrung, wenn sie genügend Anheftungsproteine, die Maltoserezeptoren, besitzen. Ihre Ausbildung wird durch die Anzucht der Bakterien in mit Maltose komplementiertem Medium erreicht. Konzentrierung der so angezogenen, sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Bakterien in $MgSO_4$-Lösung (100-fach in 10 mM $MgSO_4$) und Präadsorption der Phagen erleichtern die Phageninfektion. Tabelle 4 zeigt, welchen Einfluß das zur weiteren Vermehrung benutzte Nährmedium auf die erzielte Phagen-DNS-Ausbeute hat.

Tabelle 4: Einfluß von Medium und Aufarbeitung auf DNS-Menge und -Qualität.

Medium	Präzipitation	pfu im Pellet	DNS-Menge	Stabilität der DNS
L + Maltose	ohne PEG	$>10^{12}$	35 µg	stabil
L + Maltose	mit PEG	$\gg 10^{12}$	70 µg	nicht stabil
L + Glucose	ohne PEG	$>10^{12}$	385 µg	stabil
L + Glucose	mit PEG	$\gg 10^{12}$	1220 µg	nicht stabil

Es wurde je 1 l Medium mit Maltose und mit Glucose angeimpft, davon je die Hälfte mit PEG präzipitiert; die Phagen wurden über Stufengradienten, die DNS über CsCl-Dichtegradienten gereinigt.

Obwohl die Ausbeute an Phagenpartikeln übereinstimmt, läßt sich aus in Medium mit Maltose angezogenen Phagen nur 6-10% der DNS-Menge gewinnen, die aus parallel in Medium mit Glucose angezogenen Phagen extrahiert werden konnte. Dies liegt daran, daß sich die Phagen an die Maltoserezeptoren der Bakterientrümmer heften, die im Medium mit Maltose besonders zahlreich sind; in den weiteren Reinigungsschritten werden sie dann mit den Bakterienmembranen entfernt.
Lyse der Indikatorbakterien tritt beim Phagen λNM 762 im mit Glucose versetzten Medium nicht zuverlässig ein. Hier wurden aber mit einem Medium auf NZ-Amin-Basis (NZY) gute Ergebnisse erzielt. Dieses Medium wurde auch zur Anzucht des Phagen λEMBL 3A benutzt.
Die Präzipitation der Phagen aus dem Kulturmedium kann durch hochtourige Zentrifugation (2.2.3.2.1.) oder durch Zentrifugation nach Vernetzung der Phagenpartikel mit Polyethylenglycoll erfolgen (2.2.3.2.2.). Einen Vergleich der DNS-Ausbeute bei beiden Präparationsmethoden zeigt Tab. 4. PEG-Vernetzung führt zu einer Steigerung der DNS-Ausbeute auf doppelte bis dreifache Werte. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß die Entfernung des PEG notwendig, aber schwierig ist. Eine im EMBO-Labor (Heidelberg) entwickelte Methode (Lehrach et al., 1982; Frischauf et al., 1983) umgeht diese Schwierigkeit (vgl. 2.2.3.3.2., 2.2.3.4.2.). Wesentlich sind bei dieser Phagenaufarbeitung die Reinigung der Phagen durch zweimalige Zentrifugation über CsCl-Stufengradienten, die Behandlung mit Formamid und die Präzipitation mit Isopropanol. Diese Methode wurde zur Herstellung der DNS des Phagen λEMBL 3A benutzt; die Ausbeute betrug hier 20-30 µg DNS pro 200 ml Bakterienkultur.
Bei durch hochtourige Zentrifugation pelletierten Phagen erwiesen sich folgende Schritte als notwendig:
- eine RNase-Behandlung der pelletierten Phagen,
- die Reinigung der Phagen durch zwei diskontinuierliche CsCl-Gradienten oder einen kontinuierlichen CsCl-Gradienten,
- Inkubation der so gereinigten Phagen mit Proteinase K.

Wird einer dieser Schritte ausgelassen, enthält die Phagen-DNS-Präparation RNS oder niedermolekulare DNS oder ist nicht stabil

(d.h. bei zunehmender Lagerzeit tritt Abbau der Phagen-DNS auf; vermutlich enthält die DNS-Präparation in diesem Fall eine Nuklease). Durchschnittliche Ausbeuten lagen bei dieser, vor allem beim Phagen λNM 762 angewandten, Methode bei ca. 100 µg DNS pro 500 ml Bakterienkultur.
Wesentlich für den Einsatz von Phagen-DNS zur Klonierung ist, daß ihr Abbau mit Restriktionsenzymen vollständig erfolgt. Bei Ligation bildet nur ein Bruchteil der eingesetzten DNS in vitro verpackbare DNS-Konkatemere (ca. 1/1000, vgl. 3.2.2.3.). Deshalb führen bei Gelelektrophorese nicht mehr nachweisbare Rückstände ungeschnittener "nativer" Phagen-DNS zu einem nicht tolerierbaren Hintergrund von unveränderten Klonierungsphagen im Klonierungsansatz. Wurden die Phagen durch zweimalige CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt und die DNS mit Formamid aufgearbeitet (vgl. 2.2.3.3.2., 2.2.3.4.2.), wurde eine Phagen-DNS erhalten, die zur Klonierung verwendet werden kann.Dies wird aus Tabelle 5 deutlich. Die so isolierte λEMBL 3A-DNS gibt bei Ligation ohne Fremd-DNS weniger pfu bei anschließender Verpackung als die mit Proteinase K-Behandlung gewonnene DNS. Im System des λEMBL 3A-Phagen kann die hier eingesetzte, mit Bam HI und Eco RI geschnittene, biochemisch selektionierte DNS nach Ligation keine verpackbare DNS bilden. Alle gefundenen Plaques entstanden deshalb aus unvollständig mit Restriktionsenzymen geschnittener DNS.
Im System des λEMBL 3A-Phagen wird die Wahrscheinlichkeit, daß ungeschnittene Phagen-DNS zur Ligation eingesetzt wird, dadurch herabgesetzt, daß nacheinander mit den in der Polylinkersequenz schneidenden Enzymen abgebaut werden kann. Tab. 6 zeigt, daß auch hier das Ergebnis von der Güte der DNS-Präparation abhängt.

3.2.2.1.2. Vorbereitung der Phagen-DNS zur Klonierung

Bei Replacementphagen muß die Entstehung von Ausgangsphagen durch Ausschluß des Phagen-Mittelfragments aus dem Ligationsansatz erfolgen. Das bei allen Replacementphagen (λgtWES, λNM 762, λEMBL 3A) mögliche Verfahren besteht in einer Auftrennung der nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente

Tabelle 5: Vergleich des Anteils rekombinanter Phagen und ursprünglicher Klonierungsphagen bei verschiedenen Methoden der Phagen-DNS-Präparation.

λEMBL 3A-DNS mit Formamid aufgearbeitet	λEMBL 3A-DNS mit Proteinase K isol.	Matthiola-DNS	Verhältnis Phagen-:Fremd-DNS	Plaques pro µg Phagen-DNS
+	-	+	3:1	270
+	-	+	2:1	39
+	-	-	-	0
+	-	+	3:1	825
+	-	+	3:1	16000
+	-	-	-	370
+	-	+	3:1	800
+	-	+	2:1	400
+	-	-	-	220
-	+	+	3:1	10000
-	+	-	-	10000
-	+	+	3:1	5000
-	+	-	-	5000

Es wurde jeweils mit Bam HI und mit Eco RI abgebaute, der biochemischen Selektion unterworfene EMBL 3A-DNS eingesetzt (2.3.4.1., 3.2.2.4.). Die zur Ligation eingesetzte Matthiola-DNS wurde partiell mit Sau 3A abgebaut.

Tabelle 6: Einfluß der biochemischen Selektion auf die Ausbildung von verpackbarer Phagen-DNS im In-vitro-Ligationsansatz.

DNS-Präparation	λEMBL 3A-DNS 1*		λEMBL 3A-DNS 2*		Plaques pro µg DNS
Abbau mit Restriktionsenzymen	Bam	Bam/Eco	Bam	Bam/Eco	
	x				18 000
		x			1 800
			x		750
				x	700

* DNS 1 wurde mit Formamid, DNS 2 mit Proteinase K aufgearbeitet.

auf Grund ihrer Größe. Dies kann durch Gelelektrophorese oder Saccharosegradienten-Zentrifugation erfolgen. Bei Gelelektrophorese enthält die DNS oft Rückstände (Agarose), die bei Ligation und Verpackung geringere Effizienz bewirken (Wienand, pers. Mitteilung).
Eine vollständige Auftrennung von DNS-Fragmenten über Saccharosegradienten ist nur möglich, wenn sich die Stücke in ihrer Größe wesentlich unterscheiden. Beim Phagen λgtWES ist das der Fall (Arme: 21,7 und 13,6 kbp, gegenüber einem Mittelfragment von 5,1 kbp). Schwieriger ist eine Abtrennung des Mittelfragments beim Phagen λNM 762, denn der kleine Arm (12,7 kbp) und das Mittelfragment (8,3 kbp) liegen in ähnlichem Größenbereich. Um hier eine Abtrennung zu erreichen, muß ein flacher Saccharosegradient verwendet werden (vgl. 2.3.6.3.) und die Größendifferenz zwischen Armfragmenten und Mittelfragment dadurch gesteigert werden, daß die Arme über ihre komplementären kohäsiven Enden durch Basen-Paarung miteinander verbunden werden. Dies wird mit gleicher Effizienz durch kovalente Verbindung der λ-Phagen-DNS-Moleküle vor dem Restriktionsverdau oder durch Renaturierung der über 12 bp reichenden Einzelstrangbereiche der cos-Enden nach dem Restriktionsabbau erreicht (vgl. 2.3.6.3.). In beiden Fällen hängt das Ausmaß der Arm/Arm-Aggregat-Bildung von der DNS-Präparation, d.h. vom Vorhandensein der cos-Einzelstrangbereiche, ab. Eine auf diese Weise erreichte Auftrennung bei Saccharosegradienten-Zentrifugation zeigt Abb. 22 (vgl. Abb. 23).
Beim λEMBL 3A-Phagen kann das Mittelfragment ohne Abtrennung von der Ligation mit den Armfragmenten ausgeschlossen werden, wenn die Klonierung über Bam HI oder Sal I erfolgt. Durch Doppelabbau mit Eco RI und Bam HI (bzw. zusätzlichen Abbau mit Sal I) entstehen neben den Arm- und Mittelfragmenten Stücke von 4 bp (vgl. Abb. 21); sie bleiben bei schneller Isopropanol-Fällung der DNS im Überstand (Biochemische Selektion). Präzipitiert werden dagegen die Armfragmente mit durch Bam HI gebildeten Einzelstrangbereichen und das Mittelfragment mit von Eco RI gebildeten Einzelstrangbereichen. Eine Paarung dieser

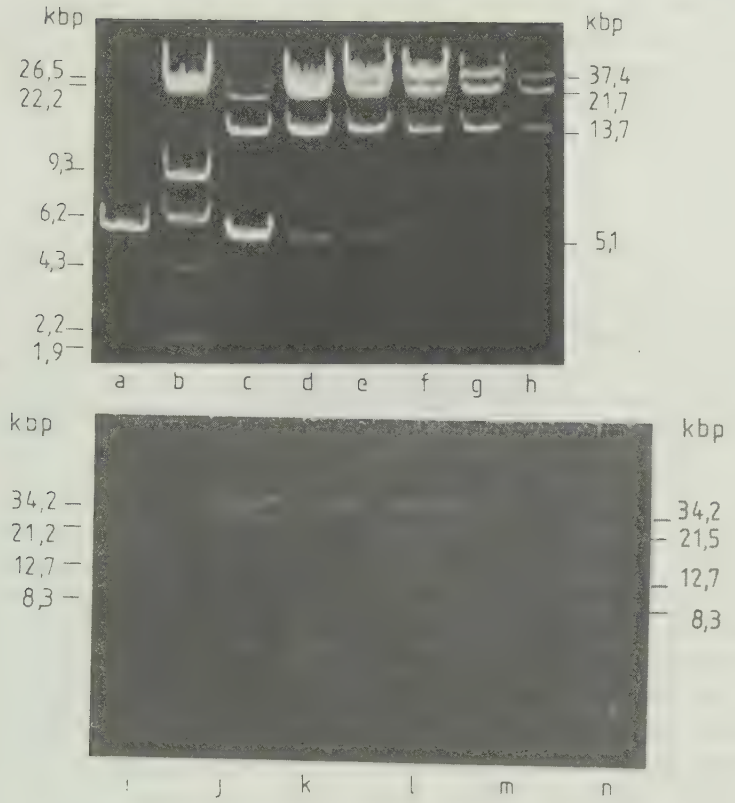


Abbildung 22: Saccharosegradienten-Zentrifugation zur Reinigung von λPhagen-DNS-Armfragmenten.
Die Zentrifugation wurde wie in 2.3.6.3. beschrieben ausgeführt.
A λgtWES, Eco RI-geschnitten, die Fraktionen 26-28 (Bahnen g-h) wurden zur Klonierung eingesetzt;
B λNM 762, Hind III-geschnitten, Armfragmente über cos-Enden vor der Zentrifugation ligiert (vgl. 2.3.6.3.), die Fraktionen 24-26 (Bahnen k-m) wurden zur Ligation eingesetzt (vgl. Abb. 23).
a λgtWES, Fraktion 16;
b λ/Hind III (Marker);
c-h λgtWES, Fraktionen 18, 20, 22, 24, 26 und 28;
i-m λNM 762, Fraktionen 22-26;
n λNM 762, Hind III-geschnitten.

Einzelstrangbereiche miteinander ist nicht möglich (Ergebnisse: Tab. 5, Tab. 6). Der Vorteil dieser Methode, Selbstligation auszuschließen, liegt darin, daß keine DNS verloren wird. Bei Saccharosegradienten-Zentrifugation werden nur 30% der eingesetzten DNS als Phagenarm-DNS wiedergewonnen (theoretischer Wert für NM 762: 81%).

3.2.2.1.3. In-vitro-Ligation von Phagen-DNS und Matthiola-DNS

Rekombinante DNS, die wie Phagen-DNS vermehrt werden kann, entsteht nur, wenn bei der Ligation die beiden Phagen-Armfragmente über ein weiteres DNS-Fragment verbunden werden. Bei der Ligation muß deshalb die Verbindung unterschiedlicher DNS-Fragmente gegenüber der Verbindung innerhalb eines Moleküls, der Zyklisierung, begünstigt werden. Die Verhältnisse bei der Ligation von Phagen-DNS unterscheiden sich damit wesentlich von denen bei Ligation im Plasmid-System. Großen Einfluß auf die Bildung rekombinanter DNS, die wie Phagen-DNS vermehrbar ist, hat das bei der Ligation eingesetzte Verhältnis von Phagenarm-DNS und fremder DNS (Dugaiczyk et al., 1975).

Den Einfluß der zur Ligation eingesetzten λ-DNS/Matthiola-DNS-Verhältnisse, aber auch der Größe der Pflanzen-DNS auf die Phagenausbeute gibt Tab. 7 an. Die Effizienz der beiden Matthiola-DNS-Größenklassen mit mittleren Werten von 9 kbp bzw. 15 kbp ist ähnlich; beide nach Größe sortierten DNS-Typen sind der Gesamt-DNS in der Phagenausbeute rund dreifach überlegen. Am meisten Phagen werden erhalten, wenn die Phagen-DNS-Menge die der Matthiola-DNS dreimal übertrifft. Dieser Wert entspricht gut dem theoretisch errechneten (Maniatis, 1982). Insgesamt scheinen Verhältnisse von 2:1 bis 3:1 von λ-Phagen- zu Matthiola-DNS günstig zu sein. Für jede DNS-Präparation wurde das beste Vektor-/Matthiola-DNS-Verhältnis bestimmt.
Die kovalente Verbindung der mit Restriktionsenzymen abgebauten DNS wird mit T_4-Ligase erreicht; für die Enzymreaktion variieren die Angaben von Inkubationstemperatur und -zeit (29°C, 90 min, Wienand, pers. Mitteilung; 10°C, länger als 12 h, Maniatis, 1982). Bewährt hat es sich, die Ligation bei Raumtemperatur zu beginnen und dann bei 12-15°C 12 bis 20 h zu inkubieren (vgl. 2.4.2.2.).

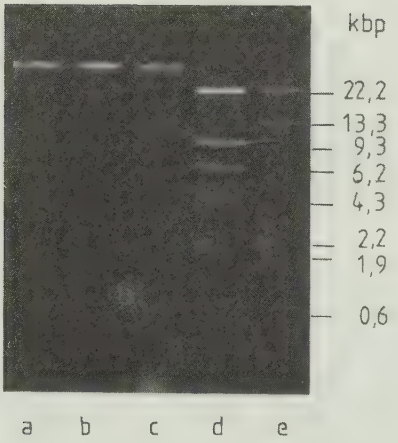


Abbildung 23: Ligation von λNM 762-Arm-DNS und unvollständig mit Hind III abgebauter Matthiola-DNS (Größenklasse 10-20 kbp). Die Ligation wurde mit 0,7 bzw. 0,8 u Ligase pro µg DNS wie in 2.4.2.2. beschrieben ausgeführt. Vor Auftrag auf das Gel wurde die ligierte DNS und die unligierte Phagen-Arm-DNS (Bahn e) auf 70°C erhitzt.
a Ligation von Phagen-Arm-DNS und Matthiola-DNS (3:1);
b Ligation von Phagen-Arm-DNS und Matthiola-DNS (2:1);
c Ligation von Phagen-Arm-DNS;
d λ-Marker/Hind III;
e Phagen-Arm-DNS, unligiert.

Tabelle 7: Einfluß des Verhältnisses Phagen-Arm-DNS/Matthiola-DNS und der Größe der Matthiola-DNS-Fragmente, die zur Ligation eingesetzt werden, auf die Phagenausbeute nach der In vitro-Verpackung.

Art der Matthiola-DNS	Verhältnis λNM 762/ Matthiola-DNS	Phagenausbeute pro µg λNM 762-DNS
Gesamt-DNS	1:1	300
6-12 kbp-Fragmente	1:1	1000-3000
	1:2	1800-3600
	1:3	11000
10-20kbp-Fragmente	1:1	1000
	1:2	1200
	1:3	6000

Die Ligation wurde mit 0,25-0,39 u Ligase pro µg DNS des Ansatzes bei 10°C über 16 h durchgeführt.

Wesentlichen Einfluß auf die Vollständigkeit der Ligation hat die Konzentration der DNS; sie sollte nicht unter 100 µg/ml liegen. Um möglichst hohe Enzymaktivität zu erreichen, wurden bei Ligation der EMBL-Phagen-DNS 1,0 u/µg T_4-Ligase zugesetzt; dies entspricht der minimal geforderten Enzymmenge (Maniatis, 1982; Lehrach et al., 1982) bei Ligation von Phagen-DNS. Das Ergebnis einer Ligation von λNM 762-Arm-DNS mit Matthiola-DNS ist in Abb. 23 dargestellt.

3.2.2.1.4. Verpackung in vitro ligierter DNS

Zur Verpackung der in vitro ligierten DNS wurde eine Kombination zweier λ-Lysate benutzt. Jedes dieser Lysate wird von Phagen gebildet, die einen Defekt auf einer anderen Stufe der λ-Morphogenese haben (BHB 2690, Dam, SE-Extrakt; BHB 2688, Eam, FTL-Extrakt; Hohn, 1979). Die Lysate liefernden Bakterienstämme tragen Prophagen mit temperatursensitiven cI-Repressormolekülen und einer Mutation im Gen des Lysisproteins S, so daß die Phagen-Proteinsynthese gut induziert werden kann, die Proteine aber nicht freigesetzt werden. Die Kombination der Mutation "recA" der Wirtsbakterien mit der "red3"-Mutation und einer Deletion in der b2-Region des Phagen verhindert, daß in die Verpackungsmixe endogene Phagen-DNS gelangt.
Die Verpackungsextrakte entstehen nach Synthese der Phagenproteine in den induzierten Bakterien, indem die Bakterien durch Ultraschall (SE-Extrakt) oder durch Einfrieren und Tauen (FTL-Extrakt) aufgebrochen werden.

Die Präparation der Verpackungsextrakte erfolgte im wesentlichen wie von Sternberg et al. (1977) beschrieben, allerdings wurde zunächst zur Anzucht der Bakterienstämme das Medium NZ benutzt. Bei der Präparation ergaben sich besondere Schwierigkeiten mit der Anzucht des im Gen E defekten Bakterienstammes BHB 2688. Die Induktion erfolgte nicht immer vollständig; so erhaltene Lysate gaben bis zu 100 x geringere Phagenausbeuten als Lysate, bei denen die Prophagen komplett induziert waren. Zur Induktion wurde daraufhin die Bakteriensuspension in einem 70°C-Wasserbad bis zum Erreichen von 45°C in der Suspension (2-3 min) heftig geschüttelt. Daraufhin wurde 30 min bei dieser Temperatur inkubiert. Die Phagenprotein-Vermehrung und -Ernte wurde dann wie zuvor durchgeführt. Die Anzucht beider Bakterienstämme im gegenüber dem NZ-Medium reicheren NZY-Medium begünstigte ebenfalls die Verpackungseffizienz, und auch hier scheint die-

ser Effekt auf der Verbesserung des FTL-Extraktes zu beruhen (Tab. 8).

Tabelle 8: Einfluß des Nährmediums bei der Anzucht der Bakterienstämme BHB 2688 und BHB 2690 auf die Verpackungseffizienz der Lysate SE und FTL.

Medium	Bakterienstamm/Extrakt	Phagenausbeute/µg λ-DNS
NZ	BHB 2690/SE	3- 4 x 10^6
NZY	BHB 2690/SE	5 x 10^6
NZ	BHB 2688/FTL	2 x 10^6
NZY	BHB 2688/FTL	5-20 x 10^6

Zur Verpackung wurde ungeschnittene NM 726-DNS eingesetzt.

Die Ausbeute an FTL-Extrakt konnte durch Ultraschallbehandlung des durch Lysozym-Wirkung und Einfrieren und Tauen erhaltenen Bakterien-Lysats gesteigert werden, ohne daß die Verpackungskapazität verlorenging (2-3 ml FTL-Extrakt pro 1,5 l Bakteriensuspension).
Mit den Verpackungsextrakten SE und FTL wurden durchschnittlich 5 x 10^7-5 x 10^6 pfu/ µg Phagen-DNS gewonnen und damit eine Effizienz, die im Bereich der in der Literatur angegebenen optimalen Werten liegt (Murray et al., 1977; Hohn, 1979; Zehnbauer und Blattner, 1982),erreicht.
Das effektivste Vorgehen bei der In-vitro-Verpackung ist in 2.4.2.3. beschrieben. Verpackungsansätze ohne exogen zugesetzte Phagen-DNS gaben keine Phagen-Plaques, und die Extrakte verloren auch nach mehrmaligem Wiedereinfrieren keine Verpackungsaktivität. Die Bestimmung der Verpackungseffizienz wurde mit einer verdünnten λ-DNS-Probe vorgenommen. Dabei wurden nur 1-2 µl DNS-Lösung (0,01-0,001 µg DNS) eingesetzt und nur 2 µl Verpackungsansatz (Gesamtvolumen 20-30 µl) zur Phagenvermehrung zu den Indikatorbakterien gegeben. Da bei in vitro ligierter DNS nur wenig rekombinante Phagen-DNS und viel nicht als Verpackungssubstrat geeignete DNS entsteht, muß zur Verpackung relativ viel DNS angeboten werden (1 µg Vektor-DNS pro Verpackungsansatz). Damit erhöht sich auch das Volumen der zur Verpackung eingesetzten DNS-Lösung. Meist betrug es 5 µl bei 1 µg Vektor-DNS. Dieses Volumen beeinträchtigt die Verpackungseffizienz geringfügig (Tab. 9).

Tabelle 9: Einfluß des Volumens der DNS-Lösung und des Anteils nicht verpackbarer DNS im Verpackungsansatz auf die Verpackungseffizienz.

Verpackungsbedingungen	Phagen-Ausbeuten pro µg ungeschnittener λNM 762-DNS
A Volumenbedingungen	
Volumen der DNS-Lösung (je 0,01 µg DNS)	
1 µl	$7,0 \times 10^6$
5 µl	$4,8 \times 10^6$
10 µl	$3,9 \times 10^6$
20 µl	$2,2 \times 10^6$
B Einfluß nicht verpackbarer DNS (Matthiola-DNS) im Verpackungsansatz	
0,01 µg NM 762-DNS	$5,2 \times 10^6$
0,01 µg NM 762-DNS + 0,1 µg Matthiola-DNS	$5,0 \times 10^6$

Durch die angebotene Menge ligierter DNS ist die Kapazität der Verpackungsextrakte nicht erschöpft, da eine Verdoppelung der Menge ligierter DNS (von 0,4 µg auf 0,8 µg, bezogen auf die λ-Vektor-DNS) auch eine Verdoppelung der erhaltenen Phagenplaques zur Folge hatte (450 Plaques und 850 Plaques). Dies beruht wohl darauf, daß auch Zusatz fremder DNS zu Phagen-DNS die Verpackungseffizienz nicht stört (Tab. 9) und der bei Ligation gebildete Anteil verpackbarer DNS gering ist.
Tab. 10 zeigt, daß das Volumenverhältnis von Indikatorbakterien und Verpackungsansatz Einfluß auf die Phagenausbeute hat. Deshalb wurde das Verhältnis von 2:1 bei den Klonierungsansätzen, wenn möglich, nicht überschritten. Wurde die zur Ligation eingesetzte λ-DNS mit Phosphatase behandelt, fiel die Phagenausbeute im Vergleich zu anderen Ligationsansätzen 20-40fach ab.

Tabelle 10: Einfluß des Verhältnisses von Verpackungsansatz und Indikatorbakterien auf die Phagenausbeute.

Verpackungsansatz	Volumen/20 µl	Plaques
A	5 µl	168
A	20 µl	240
B	5 µl	105
B	20 µl	200

zu Tab.9/10: Sämtliche hier aufgeführten Verpackungsansätze wurden in einem vom optimalen Ansatz abweichenden Verpackungsverfahren durchgeführt. Die Menge SE-Extrakt betrug 5 µl, die des FTL-Extraktes 10 µl. Werden die in 2.4.2.3. angegebenen Volumina von 2 bzw. 8 µl eingesetzt, erhöht sich die Phagenausbeute auf das Doppelte. Es wurde außerdem nach Mischen von Extrakten und DNS-Lösung und nach Inkubation auf Eis 15 min bei 30°C inkubiert. Wird wie in 2.4.2.3. beschrieben der Verpackungsansatz weiter 45 min bei Raumtemperatur gehalten, steigert sich im Vergleich die Phagenausbeute um den Faktor 3.

Tabelle 11: Anzahl von Phagen nach In-vitro-Ligation mit Matthiola-DNS.

Phage	rekombinante Phagen	Hybridisierungs-probe	Positive Klone
λgtWES	200 000	Insert pLF 56	0
λNM 762	300 000	Insert pLF 56	0
λNM 1150	40 000	Insert pLF 56	0
λEMBL 3A	165 000	Gesamt-RNS	389

3.2.2.2. Ausbeuten rekombinanter Phagen in verschiedenen Phagen-Systemen

Tab. 11 zeigt die Anzahl erhaltener Phagen bei Einsatz verschiedener Klonierungsphagen. Diese Phagen wurden nach Übertragung auf Nitrozellulose unter Hybridisierungsbedingungen II mit Insert-DNS aus pLF 56 hybridisiert. Diese Hybridisierung ergab kein Signal, oder die Signale erwiesen sich bei weiteren Untersuchungen als Artefakte. Da aber, abhängig von der Größe der im Phagen integrierten DNS, 300 000 bis 650 000 unabhängig entstandene Phagen mit 99%iger Wahrscheinlichkeit das gesamte Matthiola-Genom repräsentieren, hätte bei diesen Ansätzen eine positive Antwort erhalten werden können. Daß diese positive Antwort nicht erfolgte, läßt sich erklären durch:

- zu geringe Homologie der cDNS-Probe aus Petersilie mit Matthiola-DNS (vgl. 3.1.),
- "Kontamination" der zur Verpackung eingesetzten, in vitro neukombinierten Phagen-DNS mit ungeschnittener reiner Klonierungsphagen-DNS.

Die erste Erklärungsmöglichkeit läßt sich nicht ausschließen, jedoch sollte auch bei geringer Homologie die in den Plaques

rekombinanter Phagen enthaltene CHS-spezifische DNS ausreichen, um bei Hybridisierung ein Signal zu geben. Denn in ihnen ist eine DNS-Sequenz im Vergleich zu ihrem Anteil in gesamter genomischer DNS angereichert, und die Stärke der Hybridisierung ergibt sich aus DNS-Menge und Homologie zur ^{32}P-markierten DNS-Probe.
Die zweite Möglichkeit läßt sich im Falle des Klonierungsphagen λgtWES ausschließen, da die rekombinanten Phagen in diesem System unter Bedingungen, unter denen die Identifizierung von CHS-Sequenzen von Antirrhinum majus möglich waren (Wienand et al., 1982), gebildet wurden. Für den Test der anderen Phagen-Systeme wurden zufällig Phagenplaques ausgewählt und die Phagen-DNS präpariert.
Abb. 24 zeigt das Ergebnis von 14 DNS-Präparationen, bei denen jeweils unterschiedliche mit λNM 762-Armfragmenten und Matthiola-DNS gebildete "rekombinante" Phagen zur DNS-Isolierung eingesetzt wurden. Vom Schneidemuster des Ursprungsphagen (Bahn 8) weicht offensichtlich das Muster des Phagen in Bahn 2 ab. Bei den in den Bahnen 1, 4, 5, 11 und 16 repräsentierten Phagen ist dies wegen unvollständigen Abbaus der DNS nicht zu entscheiden. Die restlichen Phagen stimmen im DNS-Muster mit dem Ausgangsphagen überein, jedoch scheint es sich bei der DNS-Bande des Mittelfragments z.T. um eine Doppelbande zu handeln (Bahnen 9 und 13). D.h. es sind, betrachtet man nur die vollständig abgebauten DNS-Proben, von 9 Phagen 3 rekombinant. Keinem dieser Phagen fehlt jedoch ein DNS-Fragment der Größe des λNM 762-Mittelfragments (8,3 kbp) völlig (dies ist mit unbeabsichtigtem Ansatz der Lysate mit mehr als einem Plaque zu erklären). Die Größe integrierter DNS liegt bei 8,3-6,0 kbp. Klonierung im System des Phagen λNM 762 ist unter diesen Umständen dennoch möglich. Dies zeigt die Klonierung von rDNS von Phaseolus im Phagen λNM 762 (Schiebel, 1984). Die rDNS-Klonierung wurde parallel zu den Versuchen zur Bildung einer Matthiola-DNS-Bibliothek in λNM 762 durchgeführt.
Die Anzahl wirklich rekombinanter Phagen, die in λNM 762 gebildet wurden, muß nach diesen Ergebnissen auf maximal 100 000 reduziert werden. Die Größe integrierter DNS liegt dabei unter

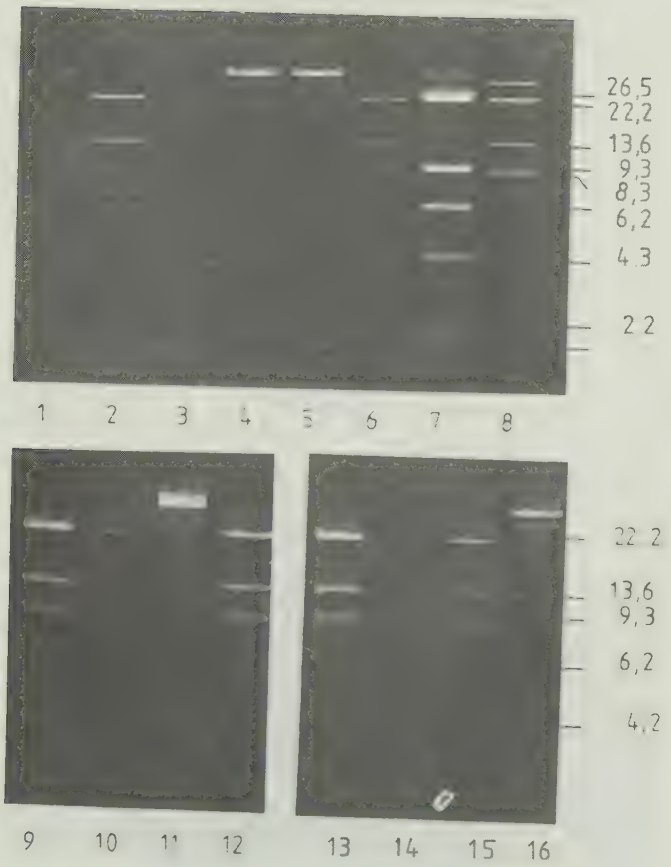


Abbildung 24: Beispiele für nach Ligation von Matthiola-DNS und NM 762-Arm-DNS entstandene Phagen.
Hind III-Abbau von bei "schneller Phagen-DNS-Präparation" gewonnener DNS (2.2.3.5.).
1-6 "rekombinante Phagen";
7 λ-Marker/Hind III;
8 λNM 762/Hind III;
9-16 "rekombinante" Phagen.

10 kbp (im Fall der Phaseolus-rDNS jedoch bei 10-11 kbp). Damit ist die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Matthiola-DNS-Fragment bereits in einem dieser Phagen repräsentiert zu haben, gering. Der hohe Hintergrund an ursprünglichen Klonierungsphagen in Klonierungsansätzen beruht weniger auf der Ligation von vorhandenen Klonierungsphagen-(Arm- und Mittel-)Fragmenten als auf mitgeschleppter nicht geschnittener Phagen-DNS (vgl. 3.2.2.1.2.). Maniatis (1982) empfielt daher, die Phagen-DNS zusätzlich mit einem Restriktionsenzym zu schneiden, das nur im Mittelfragment Erkennungssequenzen besitzt. Im Phagen λEMBL 3A ist dies durch die Poly-Linker-Sequenz möglich. Mit λEMBL 3A-DNS und unvollständig mit Sau 3A abgebauter Matthiola-DNS (Linie 04, Durchschnittsgröße 10-20 kbp) wurden 150 000 Phagen erhalten. Als Test für die Eignung dieses System zur Herstellung einer Matthiola-DNS-Bibliothek wurden die auf Nitrozellulose übertragenen Phagen mit ^{32}P-endmarkierter Matthiola-Gesamt-RNS (Blütenstadium 1-2) hybridisiert (Abb. 25A Maß für die Klonierungseffizienz in diesem System ist die Häufigkeit des Auftretens von Phagen, die rRNS-codierende Sequenzen enthalten, denn:

- diese DNS macht einen hohen Anteil der Matthiola-DNS aus (ca. 0,5%; Grierson und Hemleben, 1977),
- rRNS bildet einen hohen Prozentsatz der zur Hybridisierung eingesetzten RNS (ca. 85%); bei Hybridisierung kommt also die markierte RNS-Probe nicht ins Minimum gegenüber der sie bindenden komplementären DNS des rekombinanten Phagen.

Bei einer durchschnittlichen Größe von 15 kbp der in Phagen integrierten Matthiola-DNS muß mit 99% Wahrscheinlichkeit unter 920 Phagen einer gefunden werden, der rDNS-Sequenzen enthält. Phagen aus 37 Regionen von Agarplatten, deren Abdruck auf Nitrozellulose bei Hybridisierung Signale gab (vgl. Abb. 25A), wurden nochmals auf Platten angezogen, auf Nitrozellulose übertragen und mit radioaktiv markierter Gesamt-RNS hybridisiert. Im Rahmen der durch dieses Verfahren erreichten Anreicherung (sie ist abhängig von der Anzahl Phagen in der aus der Ausgangsplatte ausgestochenen Region) wurde in allen 37 weiteruntersuchten Fällen eine Verstärkung des bzw. eine Vermehrung der Hybridisierungssignale erreicht (Abb. 25B). Da die Auswahl der Phagen-

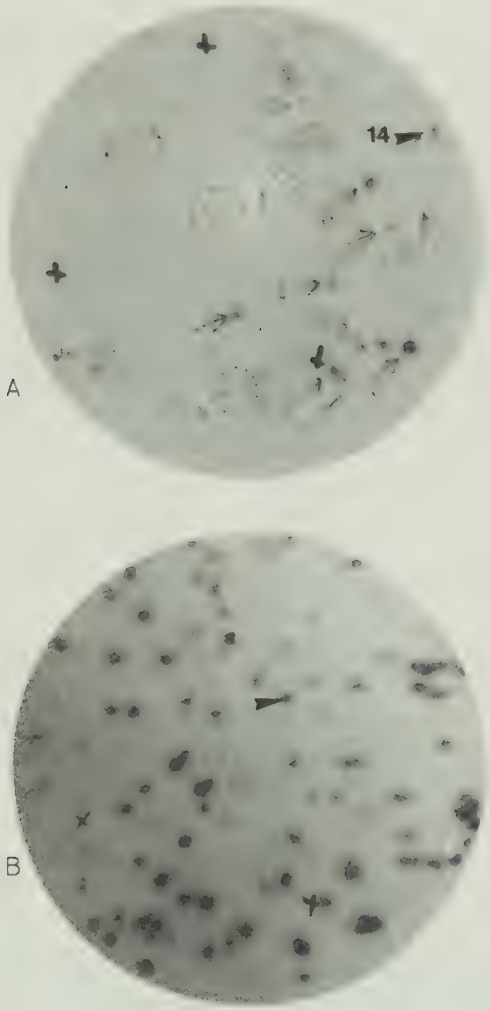


Abbildung 25: Hybridisierung von rekombinanten Phagen im Vektor λEMBL 3A mit ^{32}P-markierter Gesamt-RNS aus Matthiola-Blüten (Linie 04, Stadien I-II).
Die Phagen wurden wie in 2.4.2.4. beschrieben auf Nitrozellulose übertragen und wie in 2.5.2.2. dargestellt hybridisiert.
A Autoradiografie der Hybridisierung einer Ausgangsplatte (erster Durchgang, Exposition 14 h mit Verstärkerfolie);
B Hybridisierung der Phagen aus der mit Pfeil gekennzeichneten Region der Platte in A ("14", zweiter Durchgang, Exposition 3 Tage mit Verstärkerfolie).
Der Pfeil gibt die Lage des Phagen λEM 16/141 an.

regionen, die beim ersten Hybridisierungsdurchgang Antwort gaben, zur zweiten Hybridisierung zufällig war, muß angenommen werden, daß alle ursprünglichen Signale (ca. 390, vgl. Tab. 12) auf in den Phagen integrierten, zu RNS-Sequenzen in der Gesamt-RNS homologen Matthiola-DNS-Abschnitten beruhten.

Tabelle 12: Verteilung der Hybridisierungssignale auf verschiedene Agarplatten bei der Anzucht rekombinanter Phagen im System λ EMBL 3A.

Platte Nr.	rekombinante Phagen pro Platte	Hybridisierungssignale pro Platte
1	5×10^3	5
2	5×10^3	11
3	5×10^3	4
4	5×10^3	2
5	5×10^3	9
6	5×10^3	5
7	5×10^3	4
8	5×10^3	3
9	5×10^3	4
10	5×10^3	1
11	5×10^3	16
12	5×10^3	33
13	5×10^3	7
14	5×10^3	10
15	5×10^3	11
16	2×10^4	54
17	$>2 \times 10^4$	50
18	2×10^4	61
19	5×10^3	19
20	5×10^3	23
21	5×10^3	15
22	5×10^3	16
23	5×10^3	6
24	5×10^3	20

Nach weiterer Anreicherung der hybridisierenden Phagen über Agarplatten oder durch direkte DNS-Präparation aus Einzelplaques wurde DNS von 7 unabhängig entstandenen rekombinanten Phagen erhalten, die mit Gesamt-RNS aus Matthiola Hybride bildeten (Ergebnisse nicht dargestellt). Hybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNS der entsprechenden Matthiola-RNS-Präparation führte zu keinem entsprechenden Aufleuchten von DNS-Fragmenten (nicht dargestellt) während parallel dazu die Phagen λEM 16/1411 und λEM 19/1021 mit rRNS aus Phaseolus Hybride bildeten (vgl. 3.2.2.3., Abb. 29 und 31). D.h., daß die aus Einzelplaques angezogenen Phagen vermutlich alle rDNS enthalten.

Abb. 26 zeigt die DNS-Präparation von 9 unabhängig entstandenen Phagen (Bam HI-Abbau; die Phagen stammen aus den Regionen EM 16/141 und EM 19/101, die Phagen 16/1411 und 19/1012 erwiesen sich bei der Hybridisierung als rDNS enthaltend; diese Phagen bilden Beispiele für die im Phagen-System λEMBL 3A gebildeten rekombinanten Phagen). Jeder der Phagen weist ein anderes DNS-Fragment-Muster auf; keiner stimmt mit dem Ausgangsphagen (Bahnen 1 und12) überein. Zwei Phagen besitzen DNS-Fragmente der λEMBL 3A-Arm-Größe (19/1011, 19/1012). Dies ist dadurch zu erklären, daß Klonierung mit Sau 3A-abgebauter DNS in Bam HI-Schnittstellen in 15 von 16 Fällen mindestens eine von zwei Bam HI-Schneidestellen zerstört (vgl. Abb. 21); statt der Arm-Fragmente sind dann größere Fragmente zu erwarten (z.B. Phagen 16/1412 und 19/1013+5). Die restlichen Phagen zeigen (±) ein Fragment der Größe des großen Klonierungsphagen-Arms (16/1414) oder Fragmente von ca. 17 kbp und 11 kbp, letzteres Fragment enthält vermutlich den kleinen Phagen-DNS-Arm. Die abgebildeten Phagen enthalten Matthiola-DNS von 14-20 kbp Größe (Durchschnittsgröße: 16,5 kbp).

Die Phagen λEM 19/1012 und λEM 16/1411 wurden stellvertretend einer weiteren Charakterisierung unterzogen (3.2.2.3.).

Mit dem EMBL-Phagen-System wurden rekombinante Phagen gebildet, die Fremd-DNS, die größer als 10 kbp ist, enthielten. Die Häufigkeit des Auftretens von Klonen, die rDNS enthalten, läßt darauf schließen, daß der Hintergrund an unveränderten Klonierungsphagen in diesem System gering ist.

Es stellt sich die Frage, ob mit den bisher gebildeten Phagen (ca. 150 000, vgl. Tab. 12) für Poly(A)$^+$-RNS codierende Bereiche der Matthiola-DNS isoliert werden können. Diese DNS macht ca. 4% des gesamten Genoms aus. Mit gleicher Berechtigung wie rDNS-Sequenzen muß auch irgendeine dieser Sequenzen vorhanden sein. Für die meisten Sequenzen, die für Poly(A)$^+$-RNS codieren, wird aber der Anteil komplementärer mRNS in der Poly(A)$^+$-RNS-Fraktion zu gering sein, um ein Hybridisierungssignal zu geben; hinzu kommt, daß die spezifische Radioaktivität der Poly(A)$^+$-RNS mit 2-7 x 10^5 cpm/µg geringer war als die der Gesamt-RNS (1-7 x 10^6 cpm/µg).

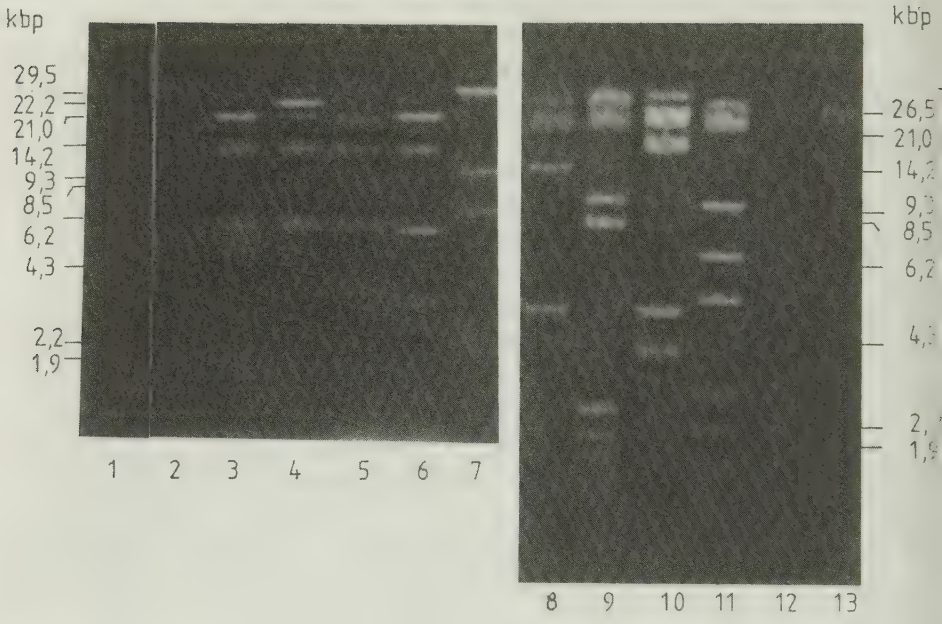


Abbildung 26: Beispiele für bei Ligation von Matthiola-DNS und λ EMBL 3A-DNS entstandene Phagen.
Bam HI-Abbau von Phagen-DNS ("schnelle Phagen-DNS-Präparation", vgl. 2.2.3.5.).
2-6 und 8-11: rekombinante Phagen, in Klammer die Größe der integrierten DNS;

1 λEMBL 3A/Bam HI;
2 λEM 16/1412 (ca. 17 kbp);
3 λEM 16/1413 (ca. 20 kbp);
4 λEM 16/1414 (ca. 16 kbp);
5 λEM 16/1415 (ca. 14 kbp);
6 λEM 16/1411 (ca. 16 kbp);
7 λ-Marker/Hind III;
8 λEM 19/1015 (ca. 14 kbp);
9 λEM 19/1011 (ca. 20 kbp);
10 λEM 19/1013 (ca. 15 kbp);
11 λEM 19/1012 (ca. 17 kbp);
12 λEMBL 3A/Bam HI;
13 λ-Marker/Hind III.

Nitrozellulosefilter mit "Abdrücken" von ca. 70 000 Phagen (Platten 12, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 23; vgl. Tab. 12) wurden nach alkalischer Hydrolyse (2.5.1.2.) der gebundenen Gesamt-RNS mit der endmarkierten Poly(A)$^+$-RNS hybridisiert. Um Hybridisierung von rRNS auszuschließen, wurden 40 µg/ml rRNS (18S- und 25S-rRNS aus Phaseolus) zugegeben. Es ergaben sich 12 schwache Signale. 6 Signale erwiesen sich im 2. Hybridisierungsdurchgang als echt. Auch die DNS aus diesen Signal-gebenden Phagen-Familien (es wurde keine Reinigung auf Einzelplaques durchgeführt) gab mit Poly(A)$^+$-RNS eine Hybridisierungsantwort, jedoch ohne offensichtlichen Unterschied auch mit der rRNS (18S- und 25S-rRNS) aus Phaseolus (Abb. 27). D.h. auch in diesem Fall wurden Phagen mit für rRNS codierenden Bereichen isoliert.
Der zweite Durchgang der Phagenhybridisierung und Southern-Hybridisierung der Phagen-DNS mit Poly(A)$^+$-RNS wurde ohne Kompetitor-RNS ausgeführt, da sich vier Hybridisierungsantworten der ersten Phagenhybridisierung nicht mit Signalen, die mit Gesamt-RNS erhalten wurden, in Übereinstimmung bringen ließen, und somit die Hybridisierung mit rRNS unwahrscheinlich schien.

3.2.2.3. Charakterisierung des rekombinanten Phagen λEM 19/1012, Eigenschaften des rekombinanten Phagen λEM 16/1411

Abb. 28 zeigt das Schneidemuster der Phagen λEM 19/1012 und λEM 16/1411 bei Abbau ihrer DNS mit Sal I; λEM 19/1012 enthält 17,4 kbp DNS, die nicht den Phagen-Armfragmenten zuzuordnen ist, der Phage λEM 16/1411 15,8 kbp. Diese Größe der Insert-DNS entspricht der zur Klonierung eingesetzten mit Sau 3A abgebauten Matthiola-DNS (Abb. 28). Zur Charakterisierung dieser integrierten DNS wurde die Phagen-DNS verschiedenen Restriktionsenzymen in Einfach- und Doppelabbauten ausgesetzt und Southern-Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 18S- und 25S-rRNS aus Phaseolus ausgeführt (Abb. 29 und 31).
Der Bam HI-Abbau des Phagen λEM 19/1012 zeigt, daß die Bam HI-Schneidestellen am Ende der Phagen-Arme erhalten blieben (Abb. 28 und 29). Das Schneidemuster dieses Phagen und die Reaktion

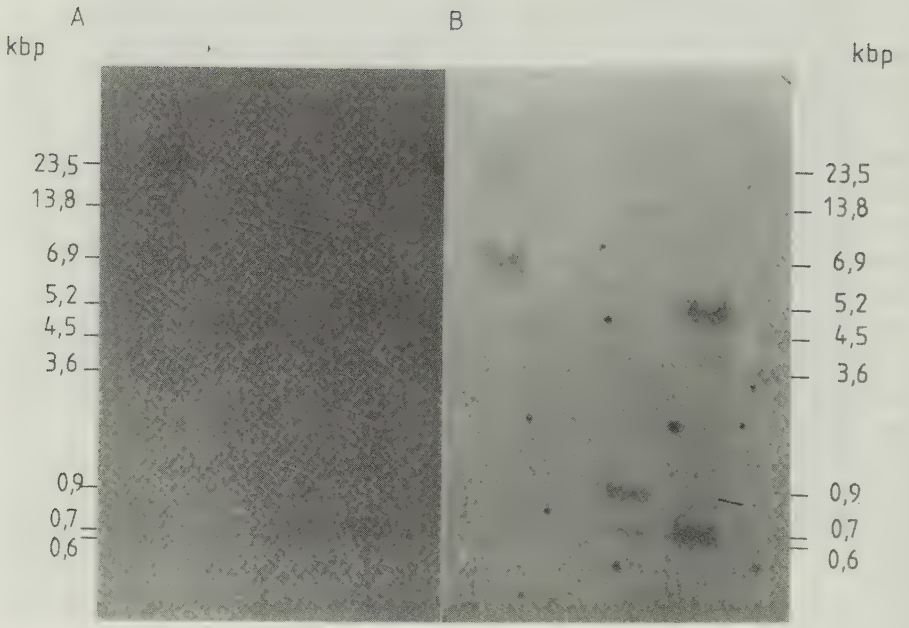


Abbildung 27: Southern-Hybridisierung rekombinanter Phagen, die beim Screening mit ^{32}P-markierter Poly(A)$^+$-RNS ein Hybridisierungssignal gaben.
Bam HI-Abbau der Phagen-DNS ("schnelle Phagen-DNS-Präparation", vgl. 2.2.3.5.).
A Autoradiografie der Hybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNS (Exposition 5 Tage mit Verstärkerfolie);
B Autoradiografie der Hybridisierung des in A eingesetzten Nitrozellulosefilters mit ^{32}P-markierter 18S- und 25S-rRNS aus Phaseolus (Exposition 18 h mit Verstärkerfolie). Vor dieser zweiten Hybridisierung wurde gebundene Poly(A)$^+$-RNS, wie unter 2.5.2.3. beschrieben, entfernt.

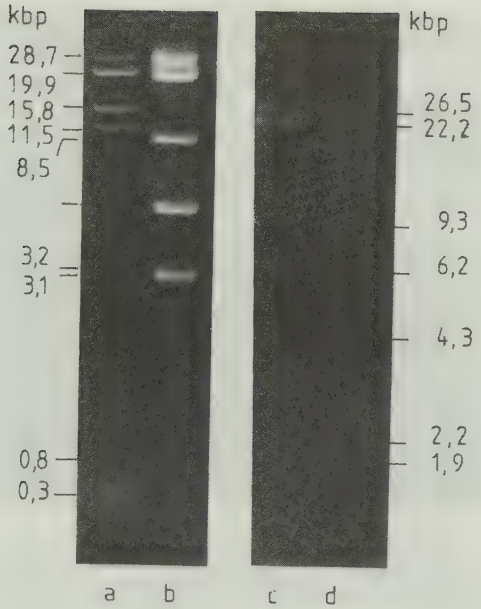
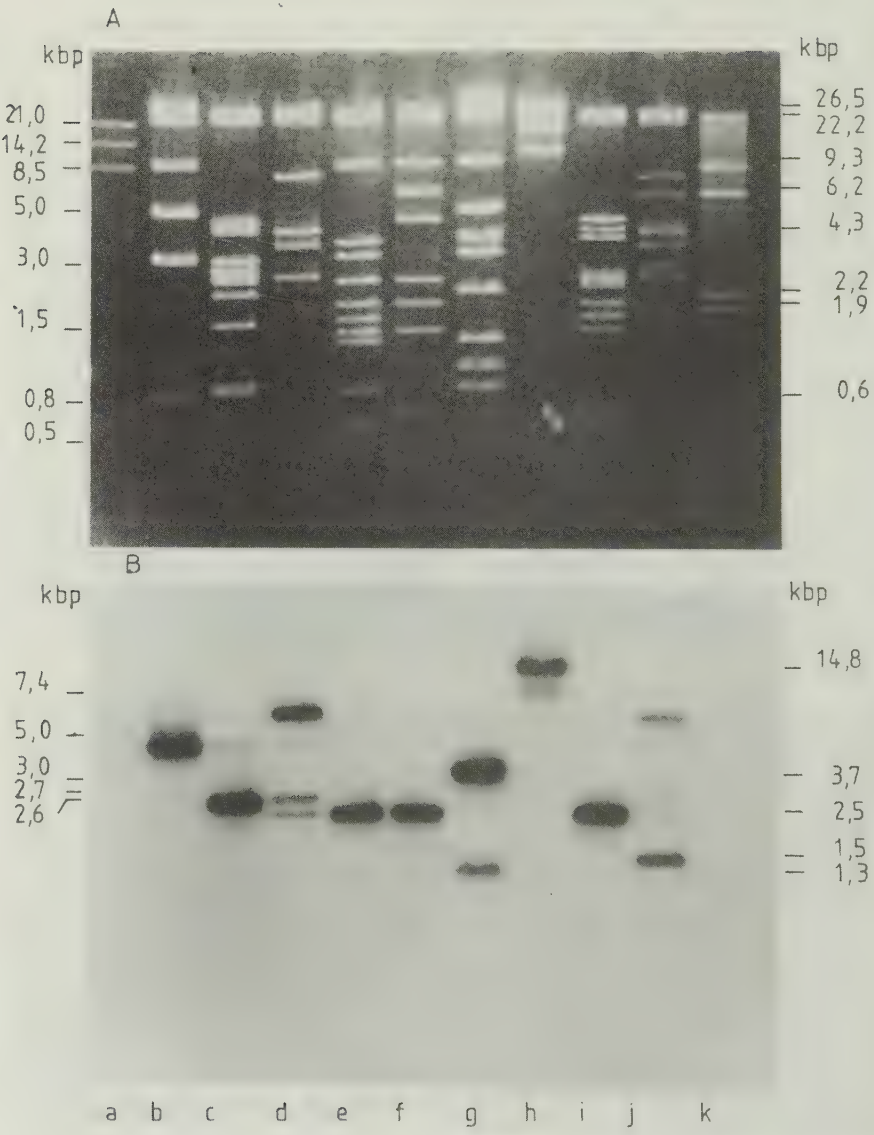


Abbildung 28: Bam HI-Abbau der DNS der rekombinanten Phagen λEM 16/1411 und λEM 19/1012 und Größenverteilung der zur Klonierung im Phagen λEMBL 3A eingesetzten, mit Sau 3A geschnittenen Matthiola-DNS (Stamm 04).
a Phage λEM 16/1411;
b Phage λEM 19/1012;
c λ-Marker/Hind III;
d partiell mit Sau 3A geschnittene Matthiola-DNS.


A
kbp
21,0
14,2
8,5
5,0
3,0
1,5
0,8
0,5
kbp
26,5
22,2
9,3
6,2
4,3
2,2
1,9
0,6
B
kbp
7,4
5,0
3,0
2,7
2,6
kbp
14,8
3,7
2,5
1,5
1,3
a b c d e f g h i j k

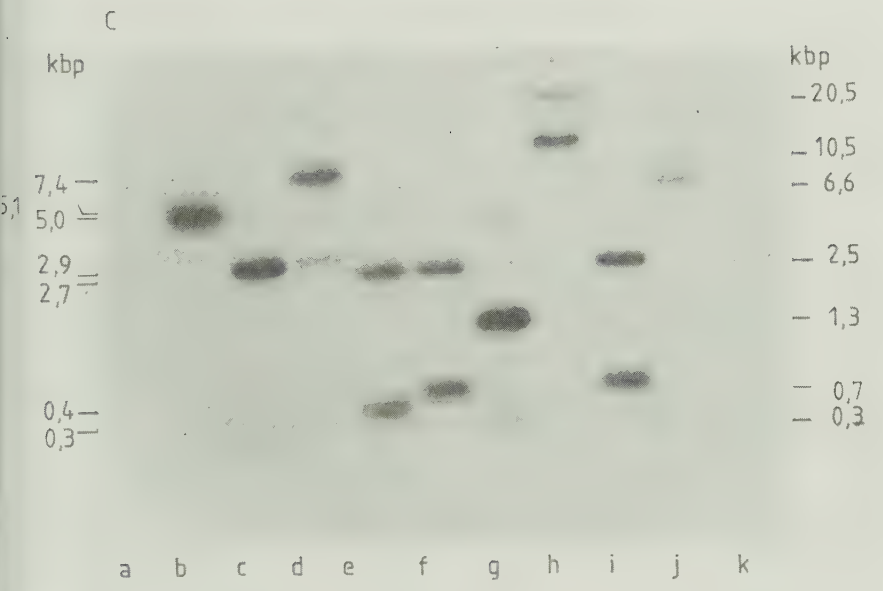


Abbildung 29: Abbau der DNS des Phagen λEM 19/1012 mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit ^{32}P-markierter rRNS aus Phaseolus.
A EtBr-gefärbtes Gel;
B Hybridisierung mit ^{32}P-25S-rRNS aus Phaseolus;
C Hybridisierung mit ^{32}P-18S-rRNS aus Phaseolus.
Vor der Hybridisierung mit 18S-rRNS wurde die gebundene 25S-rRNS wie in 2.5.2.3. beschrieben entfernt. Bei Hybridisierung mit 18S-rRNS wurde 25S-rRNS als Kompetitor zugesetzt. Expositionsdauer: A: 16 h, B: 3 Tage/mit Verstärkerfolie.
a λEMBL 3A/Bam HI;
b-j Abbau von DNS aus λEM 19/1012 mit verschiedenen Restriktionsenzymen:
b Sal I (=S);
c S/Hind III;
d Hind III (=H);
e S/Bam HI;
f Bam HI (=B);
g S/Eco RI;
h Eco RI (=E);
i H/B;
j H/E;
k λ-Marker/Hind III.

der Restriktionsfragmente mit rRNS sind in Abb. 29 dargestellt. Die kleinste Summe hybridisierender DNS-Fragmente beträgt 5,2 kbp (Bam HI-Abbau), die integrierte DNS umfaßt also keinen vollständigen rDNS-Repeat, der bei der Hauptrepetitionseinheit von Matthiola 7,4 kbp beträgt (Abb. 32; Jantzen, 1983). Dieser Repeat wird von Hind III einmal geschnitten, daneben findet man beim Hind III-Abbau genomischer Matthiola-DNS kleinere Fragmente (4,4 und 5,7 kbp), die mit 18S-rRNS schwach hybridisieren (Abb. 32). Beim Hind III-Abbau tritt eine hybridisierende Bande von 7,4 kbp auf. Die Ergebnisse anderer Restriktionsabbauten, z.B. des Sal I/Hind III-Abbaus (Summe der hybridisierenden Fragmente 5,0 kbp), zeigen, daß diese wahrscheinlich bei unvollständigem Abbau der Phagen-DNS entsteht und nicht der Hind III-Repetitionseinheit der genomischen DNS entspricht. Aus den erhaltenen Werten ergibt sich für den Phagen λEM 19/1012 die in Abb. 30 dargestellte Karte. Zu ihrer Erstellung wurden zusätzlich die Fragment-Größen von Xho I- und Sal I/Xho I-Abbau benutzt (Ergebnis nicht dargestellt). Die Lage der Hind III-Schneidestellen ist nicht gesichert, da die Hind III-, Hind III/Bam HI- und Hind III/Eco RI-Abbauten unvollständig sind. In Abb. 30B wurden die Werte, die für die rDNS des Phagen λEM 19/1012 erhalten wurden, der Karte des Hind III-Hauptrepeats der Matthiola-DNS gegenübergestellt (Jantzen, 1983). Der Phage enthält einen Teil der für die 25S-rRNS codierenden DNS (2,5-2,7 kbp) und einen kleinen Teil der für die 18S-rRNS codierenden DNS (ca. 0,7 kbp). Die am Übergang von rDNS und Phagen-DNS bestehende Bam HI-Schnittstelle tritt in der genomischen rDNS nach der Karte von Jantzen (1983) nicht auf. Sie könnte in der genomischen DNS durch Methylierung in der Mehrzahl der rDNS-Repetitionseinheiten für das Restriktionsenzym unzugänglich sein. Der größte Unterschied zwischen der in Phagen-DNS integrierten und der genomischen rDNS-Sequenz liegt in der Anzahl der Hind III-Schnittstellen; der Phage λEM 19/1012 enthält in diesem Bereich mindestens zwei Hind III-Schneidestellen, auch diese zusätzlichen Hind III-Erkennungsstellen können in der genomischen DNS vorhanden aber durch Methylierung verdeckt sein.

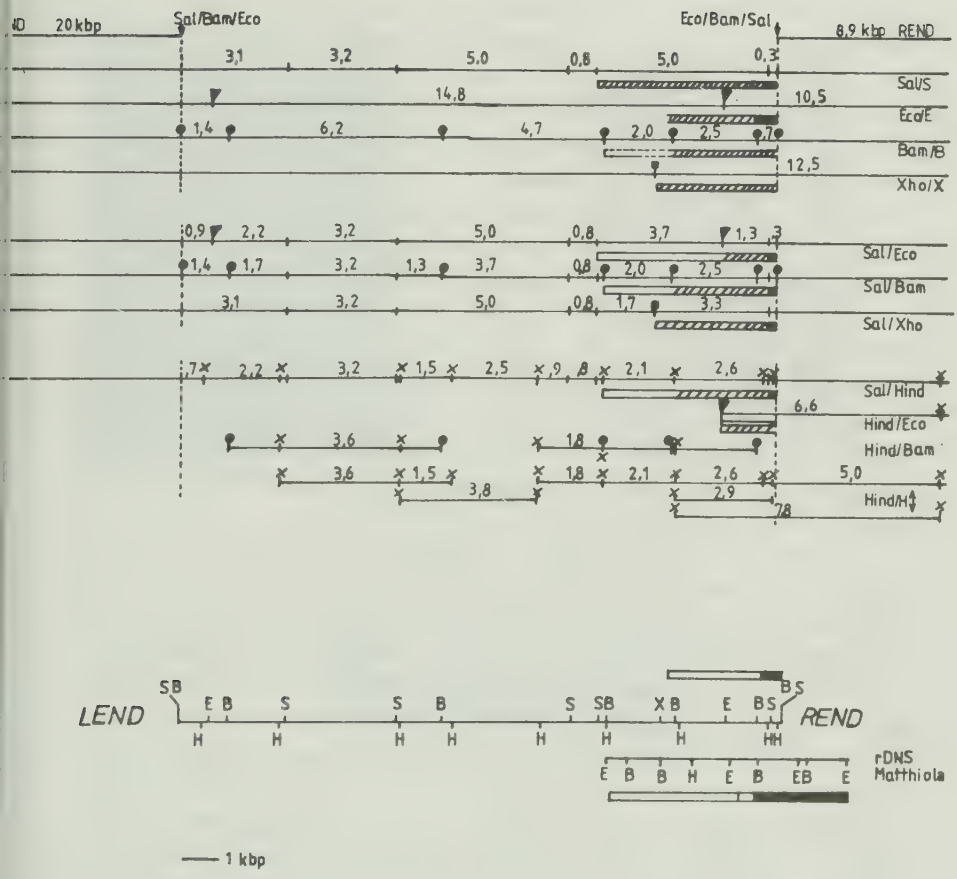


Abbildung 30: Restriktionskarte des Phagen λ EM 19/1012.
A Verteilung der DNS-Fragmente bei einzelnen Abbauten mit Restriktionsenzymen.
B Restriktionskarte des Phagen EM 19/1012 und Vergleich der mit rRNS hybridisierenden Fragmente mit denen genomischer rDNS von Matthiola (nach Jantzen, 1983).

Hybridisiert mit 25S-rRNS
25S-/18S-rRNS
18S-rRNS

Lend: linkes Phagenende; Rend: rechtes Phagenende.

Die Homologie zur genomischen rDNS hört im Bereich einer Bam HI-Schnittstelle auf. Es ist wahrscheinlich, daß λEM 19/1012 zwei verschiedene Matthiola-DNS-Fragmente enthält (5,2 und 12,2 kbp), die bei der In-vitro-Ligation aneinander gebunden wurden. Da jedoch der Anteil von DNS-Fragmenten, die kleiner als 6 kbp sind, in der zur Ligation eingesetzten Matthiola-DNS gering ist (vgl. Abb. 28d), ist solch eine Ligation ein seltenes Ereignis. Eine Entscheidung über die natürliche Lagebeziehung der Matthiola-DNS-Fragmente im Phagen λEM 19/1012 kann erst durch Hybridisierung von Matthiola-DNS mit Phagen-DNS-Teilfragmenten erreicht werden.
Für den Phagen λEM 16/1411 liegen verläßliche Werte nur für die Größe der Sal I- und Bam HI-Fragmente und - mit Einschränkungen - für den Hind III-, Hind III/Bam HI- und den Eco RI-Abbau der Phagen-DNS vor. Während beim Sal I-Abbau von λEM 16/1411 die EMBL 3A-Phagenarme mit kleiner Abweichung auftreten (der kleine Arm hat eine Größe von 11 kbp; Abb. 28), zeigt der Bam HI-Abbau eine Veränderung des großen Klonierungsphagenarms (Abb. 31). Aus den Restriktionsabbauten ergibt sich folgendes Bild: Integrierte rDNS ist an den großen Phagenarm gebunden; sie besteht v.a. aus Regionen, die für 25S-rRNS codieren, denn die Hybridisierung mit 18S-rRNS ist schwach und auf ein Bam HI-Fragment beschränkt. Die rDNS-Sequenz enthält keine Hind III-Schneidestelle. Eine mit diesen Ergebnissen übereinstimmende vorläufige Karte des Phagen λEM 16/1411 zeigt Abb. 31B. Diese Karte muß durch weitere Analysen überprüft werden. Sicher ist jedoch, daß auch dieser Phage keinen vollständigen rDNS-Repeat enthält, es fehlt fast die gesamte 18S-rRNS-Region. Dagegen ist möglicherweise die gesamte 25S-rRNS-Sequenz mit dem nicht transkribierten Spacer enthalten. Neben der Frage nach der Lagebeziehung der klonierten rDNS und der restlichen im Phagen integrierten DNS stellt sich hier zusätzlich die Frage, ob der DNS-Umbau, der die Phagen-DNS-Arme betroffen hat, auch auf die integrierte Matthiola-DNS übergegriffen hat.
18S- und 25S-rRNS werden in einem "precursor"-RNS-Molekül gemeinsam transkribiert. Der Transkriptionsstartpunkt liegt vor

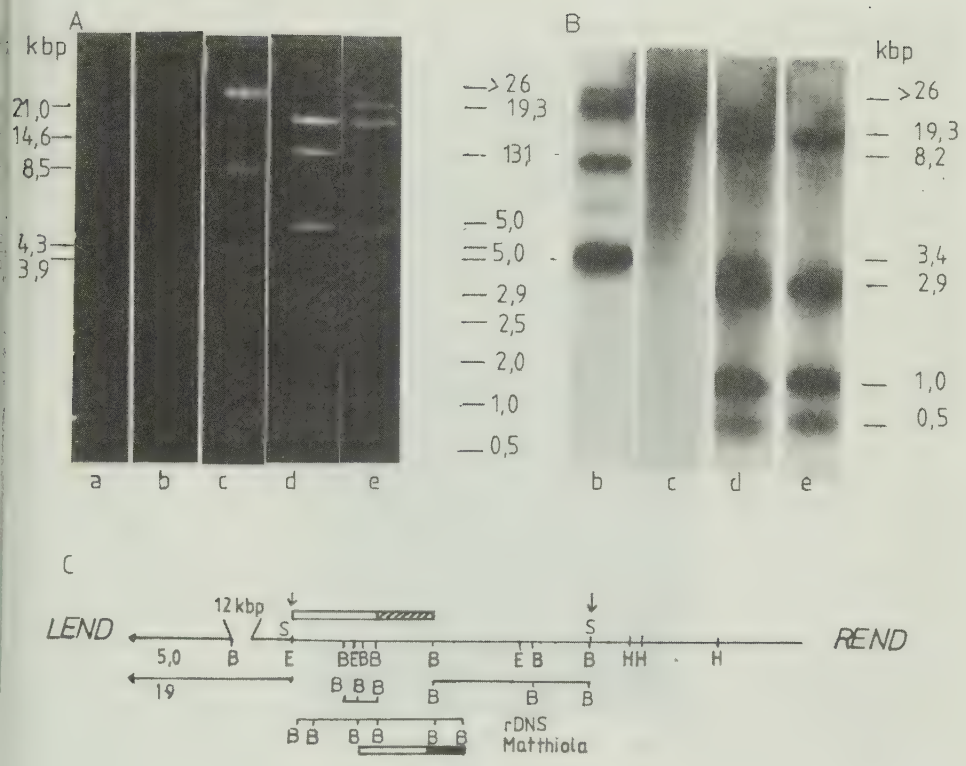


Abbildung 31: Eigenschaften des Phagen λEM 16/1411.
A EtBr-gefärbtes Gel;
B Autoradiografie nach Southern-Hybridisierung, Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 25S-rRNS aus Phaseolus;
C mögliche Restriktionskarte des Phagen λEM 16/1411 und Vergleich der hybridisierenden Fragmente mit der genomischen rDNS aus Matthiola (nach Jantzen, 1983).
a λEMBL 3A, Bam HI-Abbau;
b-e: Abbau der DNS des Phagen λEM 16/1411 mit verschiedenen Restriktionsenzymen:
b Eco RI (E);
c Hind III (H);
d Bam HI (B);
e Hind III/Bam HI.

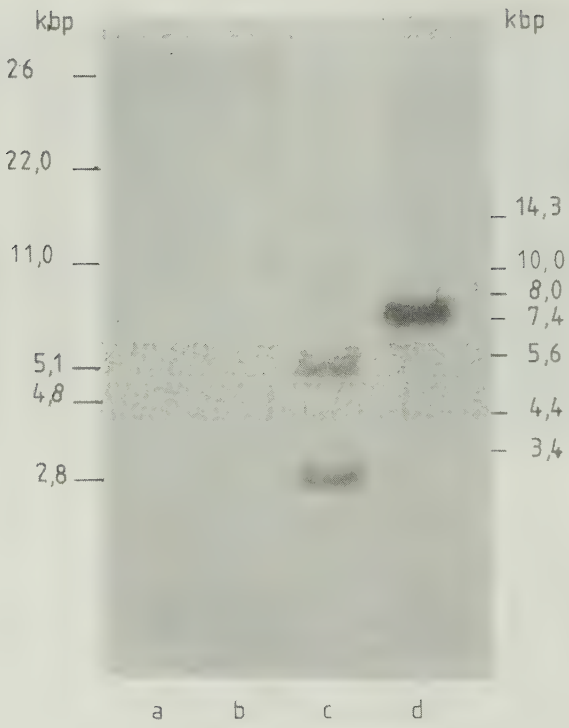
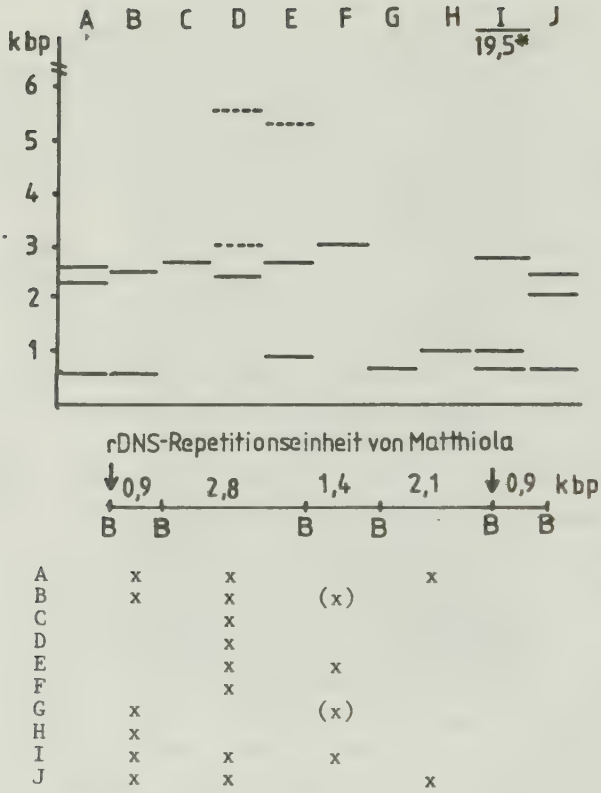


Abbildung 32: Southern-Hybridisierung genomischer Matthiola-DNS (Linie 04) mit ^{32}P-markierter 18S-rRNS aus Phaseolus unter den in Abb. 30 beschriebenen Bedingungen (Auftrag je 5 µg, Exposition 3 Tage mit Verstärkerfolie).
a Xho I;
b Sal I;
c Bam HI;
d Hind III.

der 18S-rRNS-Sequenz, in diesem Bereich müssen deshalb auch Promotorstrukturen liegen. Da beide rekombinanten Phagen 18S- und 25S-rRNS-Teilsequenzen enthalten, müssen Bereiche des transkribierten Spacers oder Teile des nicht transkribierten Spacers der rRNS und damit wahrscheinlich Promotorstrukturen in den Phagen repräsentiert sein. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft,kann erst durch Untersuchungen mit weiteren geeigneten Hybridisierungsproben (z.B. den rDNS aus Phaseolus enthaltenden Phagen) entschieden werden.
Für weitere 12 rekombinante Phagen wurde die Größe der rRNS-bindenden Bam HI-Fragmente bestimmt. Abb. 33 gibt einen Überblick über ihre Anzahl und Größe. Die meisten Werte (außer I und J) wurden mit Phagen-DNS aus Minipräparationen gewonnen. Bei dieser DNS-Präparationsart ist kein vollständiger Abbau der DNS mit Restriktionsenzymen zu gewährleisten, und große hybridisierende Banden in D, E und F können auf unvollständigem Abbau beruhen. In D-H wurde DNS aus Phagengemischen (max. 10 verschiedene Ausgangsphagen) isoliert. Keiner der untersuchten Phagen besitzt alle vier Bam HI-Fragmente des Matthiola-rDNS-Repeats; fast alle tragen jedoch das 2,8 kbp große Fragment. Keiner der Phagen kann mit den eingebauten rDNS-Fragmenten überleben (minimale Insert-Größe: 9 kbp), und die Größe der in EMBL-Phagen integrierten DNS liegt in allen bisher untersuchten Fällen (vgl. Abb. 24) über 12 kbp. Bei den untersuchten rDNS-enthaltenden Phagen muß also das seltene Ereignis der Ligation von DNS, die kleiner als 6 kbp ist, mit anderer Matthiola-DNS und den Phagen-Armfragmenten angenommen werden. Demgegenüber sollte die Integration eines einzigen, mindestens einen rDNS-Repeat (7,4 kbp) enthaltenden Fragments bevorzugt sein. Sind allerdings die in der rDNS enthaltenen Bam HI-Schnittstellen bevorzugte Schnittstellen des Enzyms Sau 3A, könnten kleinere rDNS-Fragmente in der nur teilweise abgebauten Matthiola-Gesamt-DNS eine Untergruppe nahezu vollständig abgebauter DNS bilden und ihre Verteilung auf die rekombinanten Phagen verständlich machen.
Das Screening der mit λEMBL 3A gewonnenen Phagen mit ribosomaler RNS zeigt,daß dieses System hohe Ausbeuten rekombinanter



A	x	x		x	
B	x	x	(x)		
C		x			
D		x			
E		x	x		
F		x			
G	x		(x)		
H	x				
I	x	x	x		
J	x	x		x	

Abbildung 33: Größe und Anzahl mit rRNS aus Phaseolus hybridisierender Bam HI-Fragmente in 10 verschiedenen rekombinanten Phagen.

A Größe der mit rRNS hybridisierenden Phagen-DNS-Fragmente bei Bam HI-Abbau;

B Zuordnung von Phagen-DNS-Fragmenten und rDNS-Fragmenten genomischer Matthiola-DNS (Bam HI-Abbau, Karte nach Jantzen, 1983).

*Dieses Fragment enthält einen Teil des linken Phagen-DNS-Arms (ca. 15 kbp).

Phagen erlaubt und die aufgenommene DNS größer als 12 kbp ist. Es zeigt aber auch, daß Vorsorge getroffen werden muß, damit bei den In-vitro-Manipulationen nicht DNS-Fragment-Kombinationen hergestellt werden, die von den natürlichen Verhältnissen abweichen.

4. DISKUSSION

Über die molekulare Struktur eukaryontischer Gene war bis vor wenigen Jahren wenig bekannt. Die Entdeckung von Restriktionsenzymen (Arber, 1974), die Konstruktion von Vehikeln zur Vermehrung definierter DNS-Fragmente (Bolivar und Rodriguez, 1975) und gut ausgearbeitete Hybridisierungs- und Sequenzierungsmethoden (Southern, 1975; Maxam und Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977) haben in den letzten Jahren eine Fülle von Daten über DNS- und RNS-Strukturen geliefert. Aus ihnen ergibt sich das Modell eines eukaryontischen Gens: Die zur Pribnow-Box der Prokaryonten homologe ATA-Box ist essentiell für die Transkription und für den Transkriptionsstart (Corden et al., 1980). Sie wird gefolgt von der "cap-site", und am Ende des Gens befindet sich ein Signal für die Polyadenylierung. Vor der ATA-Box liegt die CAAT-Box; diese und weitere vor dem transkribierten Genbereich gelegene Strukturen haben Einfluß auf die Transkriptionsrate des Gens. Abweichend von diesem Schema für von Polymerase II transkribierte Gene liegen Promotor-artige Sequenzen bei Genen, die von RNS-Polymerase III abgelesen werden (z.B. 5S-rRNS, tRNS; Galli et al., 1981), innerhalb der transkribierten Sequenz. Diese gemeinsamen Strukturen geben keinen Hinweis darauf, wie die differentielle Aktivierung von Genen zur Transkription erreicht wird. Lediglich für die Gruppe der Heat-Shock-Gene wurde eine typische Promotorstruktur gefunden (Karch et al., 1981), und Ergebnisse bei Immunglobulingenen zeigen die Einschaltung von Zelltyp-abhängigen, die Transkription steigernden Sequenzen (Enhancer; z.B. Gillies et al., 1983). Die Suche nach Elementen der differentiellen Genexpression macht die Untersuchung von solchen Genen, deren Aktivität entwicklungsabhängig gesteuert ist, oder die durch einen Impuls aktiviert werden, besonders interessant.

Ein Beispiel für ein pflanzliches Gen, das den Mechanismen der differentiellen Genexpression unterliegt, bildet das Chalkonsynthase-Gen. Aktivität und Proteinmenge erfahren während der Blütenentwicklung in Matthiola incana eine Steigerung (Spribille

und Forkmann, 1981; Rall, 1983; Rall und Hemleben, 1984), die Genaktivität ist im wesentlichen auf die Blüte beschränkt, und in Petersilie-Zellkulturen wirkt Licht als Induktor der spezifischen mRNS-Synthese.
Voraussetzung für die Untersuchung von DNS-Strukturen ist das Vorliegen einer einheitlichen Nukleinsäure-Probe - der spezifischen mRNS oder der cDNS. Da das Chalkonsynthase-Protein keinen prominenten Bestandteil der Blütenproteine von Matthiola bildet (Rall, 1983) und nicht gereinigt vorliegt, sollte untersucht werden, ob eine aus Petersilie-Zellkulturen gewonnene cDNS genügend Homologie zur Gensequenz von Matthiola aufweist, um eine spezifische DNS/DNS-Hybridisierung zu ermöglichen. Petersilie-Chalkonsynthase-cDNS liegt als Insert-DNS in den Plasmiden pLF 12 und pLF 56 vor.
Zur Charakterisierung und Klonierung von Genen, die vor allem bei verschiedenen Tierarten erfolgte, wurde meist eine aus demselben System stammende cDNS verwendet. Dies liegt daran, daß die untersuchten Gene relativ leicht zugänglich waren, da sie in spezialisierten Zellen dominierende mRNS-Spezies codieren (z.B. Globin-Gene, Ovalbumin-Gene, Lactalbumin-Gene und Immunglobulin-Gene); cDNS-Proben anderer Tierspezies wurden bei Isolierung dieser Gene lediglich als Hybridisierungskontrolle eingesetzt (Wilson et al., 1978). Die meisten der bisher klonierten Pflanzengene wurden ebenfalls mit Hilfe von cDNS-Sequenzen des untersuchten Systems isoliert. Auch hier wurden leicht zugängliche Gene ausgewählt: Gene der Speicherproteine, deren mRNS-Anteil bei der Samenentwicklung hoch ist (z.B. Fischer et al., 1982; Schuler et al., 1982; Sun et al., 1981); das Leghämoglobingen, das das Hauptprotein der Wurzelknöllchen codiert (Hylding-Nielsen et al., 1982); und das Alkoholdehydrogenasegen, dessen mRNS-Anteil durch anaerobes Wachstum 50fach gesteigert werden kann (Döring et al.,1984; Peacock et al.,1983). Bei anderen Systemen ist zumindest die Menge des gencodierten Proteins hoch und damit die Bildung eines Antiserums einfach. Mit seiner Hilfe kann die spezifische mRNS gereinigt werden (Sucrosesynthase, Burr und Burr, 1982; Waxy-Locus, Shure et al., 1983; Amylase, Baulcombe et al., 1983; kleine Untereinheit der

Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase, Bedbrook et al., 1980). In keinem dieser Fälle bestand Veranlassung, mit einer Nukleinsäure-Probe aus einem heterologen System zu arbeiten.
Obwohl rRNS den größten Teil der Gesamt-RNS ausmacht, wurde rRNS bzw. rDNS zur Hybridisierung zwischen verschiedenen Pflanzenarten benutzt (Appels und Dvořák, 1982; Friedrich et al., 1979; Rafalsky et al., 1983). Ribosomale RNS ist, da sie selbst und nicht ein codiertes Protein die Funktionsstruktur bildet, direkt dem Selektionsdruck ausgesetzt und deshalb stark konserviert. Zu den zwischen den verschiedenen Organismen am wenigsten veränderten Proteinen gehören die Histone, besonders die Histone H3 und H4. Histon-Gensequenzen aus Psammechinus (Schaffner,1976) wurden erfolgreich zum Fischen der Histongene verschiedener Tiere eingesetzt (Übersicht in Hentschel und Birnstiel, 1981). Mit dieser DNS-Probe war es auch möglich, das Histon H4-Gen von Weizen zu isolieren (Tabata et al., 1983). Aber auch bei Proteinen, bei denen teilweise Übereinstimmung der DNS-Sequenz durch gemeinsamen Ursprung der Gene gegeben ist und durch die Funktion des Proteins aufrecht erhalten wird, findet man Basenpaarung konservierter DNS-Regionen. Obwohl sich die Aminosäuresequenz der Tubuline von Seeigel und verschiedenen Vertebraten unterscheidet, reicht die DNS-Sequenzhomologie zur Hybridisierung aus (Cleveland, 1980). Dasselbe gilt für das Actingen, bei dem eine Hybridisierungskreuzreaktion zwischen Dictyostelium-, Drosophila-, Hühnchen- und Seeigel-spezischen Sequenzen auftritt (Durcia et al., 1980; Fryberg et al., 1980). Mit Hilfe des Actingen-Klons aus Dictyostelium konnten Shah et al. (1983) aus Bibliotheken genomischer DNS von Mais und Glycine Actin-Gensequenzen isolieren.
Voraussetzung für den Einsatz heterologer Nukleinsäure-Proben zur Charakterisierung eines Gens ist, daß die codierten Proteine konservierte Strukturen aufweisen. Die Kreuzreaktion des Antiserums, das gegen die Chalkonsynthase von Petersilie gebildet wurde, mit Phaseolus vulgare (Lawton, 1983), Glycine max (Schröder et al., 1979), Antirrhinum majus, Petunia hybrida (Mol et al., 1983) und Matthiola incana (Rall, 1983) zeigt, daß das Chalkonsynthase-Protein evolutionär konservierte Strukturen be-

sitzt. Es ist wahrscheinlich, daß sich diese Verwandtschaft auf Proteinebene auch auf DNS-Ebene widerspiegelt. In diesem Fall sollte ^{32}P-markierte DNS der Klone pLF 12 und pLF 56 im Southern-Hybridisierungsexperiment definierte Matthiola-DNS-Fragmente markieren.

Da die Chalkonsynthase als Produkt eines Strukturgens mit ein (bis wenigen) Kopien pro Genom-Äquivalent vorhanden ist, muß durch Hybridisierung eine geringe DNS-Menge nachgewiesen werden; der Anteil Chalkonsynthase-spezifische Sequenzen tragender DNS-Fragmente an der untersuchten DNS ist abhängig von der Grösse des sie tragenden DNS-Stückes. Umfaßt dieses Fragment 12 kbp, macht es einen Anteil von 10^{-5} der Matthiola-DNS aus; bei 5 µg elektrophoretisch aufgetrennter DNS sind es also 50 pg. Obwohl die spezifische Radioaktivität der nicktranslatierten pLF 56-DNS hoch war (10^{7} bis 2 x 10^{8} cpm/ µg), war erst bei Einsatz von Dextransulfat zur Hybridisierungslösung der Nachweis von 50 pg pLF 56-DNS durch Hybridisierung möglich. Da linearisiertes pLF 56 (5,7 kbp) mit markierter pLF 56-Insert-DNS (1,3 kbp) hybridisiert wurde, liegt die erzielte Nachweisgrenze noch niedriger (Minimalwert 12 pg). Dextransulfat erleichtert die Ausbildung der Hybride dadurch, daß die Konzentration der radioaktiv markierten DNS-Probe in der wässrigen Lösung erhöht wird, denn ein großer Teil des Wassers ist als Hydrathülle ans Dextransulfat gebunden. Gleichzeitig wird bei denaturierten DNS-Proben die Ausbildung netzartiger Strukturen der DNS begünstigt. Der Nachteil der Hybridisierung mit Dextransulfat liegt in der oft starken Hintergrundschwärzung (Wahl et al., 1979; Maniatis, 1982). Dieser starke Hintergrund wird von Wahl beobachtet, wenn die Hybridisierungszeiten 18 h übersteigen. Hybridisierung über mindestens 20 h ist aber beim Chalkonsynthasegen notwendig, um eine vollständige Absättigung homologer Sequenzen zu gewährleisten. Griffin-Shea et al. (1980) und Gupta et al. (1982) reduzieren diese unspezifische Hintergrundhybridisierung (bei einer homologen/heterologen DNS/DNS-Hybridisierung) durch Waschen mit 3 mM bzw. 10 mM ungepufferter Tris-Lösung bei Raumtemperatur.

Die bei Hybridisierung der Matthiola-DNS eingesetzten Bedingun-

gen entsprachen denjenigen, die zur Charakterisierung des Chalkonsynthasegens von Mais und Antirrhinum mit Hilfe von pLF 56-Insert-DNS (Wienand et al., 1982 und pers. Mitteilung) eingesetzt wurden. Mit ihnen wurde zum ersten Mal eine Hybridisierung der Matthiola-DNS mit gereinigter pLF 56- bzw. pLF 12-Insert-DNS gefunden. Dies ist zum großen Teil auf die Wirkung von Dextransulfat zurückzuführen, beruht aber z.T. auch darauf, daß die Hybridisierungsbedingungen für die ^{32}P-markierte DNS-Probe optimiert wurden. Hybridisierung wird im allgemeinen bei Temperaturen ausgeführt, die 20-25°C unter dem T_m-Wert liegen. Der T_m-Wert eines Hybrids hängt ab von der Na^+-Ionenstärke im Medium, vom Anteil an G/C-Paaren und vom Ausmaß der Fehlpaarungen in den gebildeten Hybriden; 1% Fehlpaarung erniedrigt den T_m-Wert um ca. 1°C. Durch die benutzte Hybridisierungstemperatur wird also die Spezifität der Reaktion bestimmt.
Tab. 13 gibt an, welcher Grad an Fehlpaarungen bei den verschiedenen bei Hybridisierung von Matthiola-DNS eingesetzten Bedingungen tolerierbar ist. Der T_m-Wert wurde nach der Formel von Beltz et al. (1983) für DNS-Hybride von 1000 bp und einem G/C-Gehalt von 50% berechnet. Da nur bei Hybridisierungsbedingungen II und III zuverlässig ein Hybridisierungssignal erhalten wurde, muß angenommen werden, daß die Homologie zu den zur Hybridisierung eingesetzten Proben 87-84% betrug.

Tabelle 13: Kriterium der verwendeten Hybridisierungsbedingungen (vgl. 2.5.2.1.).

Hybridisierungs-Bedingung	T_m-Wert °C	opt. Hybrid.-Temperatur °C	Hybrid.-Temp. °C	tolerierte Fehlpaarung %
I	98,7	74-79	70[1)]	4- 9
Ia	98,7	74-79	60	14-19
II	95,5	71-76	60	11-16
III	95,5	71-76	58,5[1)]	12,5-17,5

1) 1% Formamid wurde mit 0,66°C eingerechnet.

Der T_m-Wert wurde jeweils für ein DNS-Hybrid von 1000 bp Länge und einem G/C-Gehalt von 50% berechnet nach der Formel
$T_m = 81,5 + 0,41(\%G/C) + 16,6 \log Na^+ - (300+2000\ Na^+)/d$
wobei d= Ø-Länge des Hybrids (bp); diese Formel gilt ohne Einschränkung nur bei 0,01-0,4 M Na^+-Konzentrationen (Beltz et al., 1983).

Die Hybridisierungsbedingungen I und Ia unterscheiden sich in bezug auf den von einer DNS-Sequenz angenommenen T_m-Wert nicht stark von den Hybridisierungsbedingungen II und III (Tab. 13), darum ist anzunehmen, daß der Einfluß von Dextransulfat für die Hybridisierungsantwort ausschlaggebend ist.

Tabelle 14: Hybridisierungsbedingungen bei Hybridisierung in homologen/heterologen Systemen.

Gen	Organismus	T_m-Wert °C	Hybr.-Temp. °C	Toler. Fehlp. %	Autor
A Homologe Systeme:					
Globin	Kaninchen	95,8	65	11 (4)	Jeffreys, 1977
Actine	Hühnchen	95,8	74	2	Cleveland, 1980
Zein	Mais	95,8	65	11 (4)	Wienand, 1981
Actin	Glycine	97,5	78	-	Shah, 1983
Cin-Element	Mais	95,8	65	11 (4)	Gupta , 1983a
Ds-Element	Mais	99,6	68	11 (2)	Burr, 1981
Lectine	Glycine	98,7	75	4	Goldberg, 1983
5,8S-rRNS	Lupine	93,9	65	9 (1)	Ralafsky, 1983
Sucrosesyn.	Mais	98,7	75	4	Fedoroff, 1983
Chlor. a/b-light-harv. Protein	Gerste	98,7	67	12 (2)	Gollmer, 1983
B Heterologe Systeme:					
ß-Lactalbum.	Mensch/ Meerschwein	96,8	65	12 (0)	Hall, 1982
Actine und Tubuline	Hühnchen/ Vertebraten	95,8	74	2	Cleveland, 1980
Histon H4	Seeigel/ Weizen	~102	70	12 (7)	Tabata, 1983
Actin	Dictyost./ Glycine	98,7	60	18,7 (14)	Shah, 1983
	Mais	99,6	45	35 (9)	Shah, 1983
5,8S-rRNS	Schizomyces/ Lupine	93,9	65	10 (1)	Rafalsky, 1983
Chalkonsyn.	Petersilie/ Antirrhinum	95,8	60	15,8 (9)	Wienand, 1982

Berechnung des T_m-Wertes wie in Tab. 13 angegeben. In Klammern sind die bei den Waschvorgängen tolerierten Fehlpaarungen (%) angegeben, wenn das Kriterium der Waschvorgänge von dem der Hybridisierung abwich.

Wird das Hybridisierungskriterium herabgesetzt, um heterologen DNS-Abschnitten eine Paarung trotz partiell abweichenden Sequenzen zu erlauben, steigt die Gefahr, daß unspezifische Hybri-

disierungssignale entstehen. In Tab. 14 sind bei Hybridisierung in verschiedenen Systemen angewandte Kriterien angegeben. Auch bei homologen Proben werden Fehlpaarungen bei der Hybridisierung gestattet, sie liegen je nach System zwischen 2 und 12%. Jedoch werden eventuell vorhandene fehlgepaarte Hybride durch die Waschvorgänge wieder abgelöst. In Systemen, in denen nicht homologe Hybridisierungsproben eingesetzt wurden, liegt die Grenze tolerierter Fehlpaarungen in den Hybriden wenig höher, bei den Waschschritten werden jedoch weniger stringente Bedingungen angewendet.

In 4 der 6 gezeigten Beispiele werden 7-14% Fehlpaarung in Kauf genommen. Dennoch kann in diesen Fällen spezifische Hybridisierung wahrgenommen werden. Das bei der Hybridisierung von Matthiola-DNS mit pLF 56-Insert-DNS angewandte Waschkriterium (0,2 x SSPE, 0,1% SDS, 60-50°C) führt zur Stabilität von Hybriden mit höchstens 7% fehlgepaarten Basen. Unspezifische Paarung von DNS-Sequenzen dürfte also kein Hindernis bei der Identifizierung Chalkonsynthase-spezifischer Sequenzen bilden. Es ergibt sich aber kein augenfälliger Unterschied im Hybridisierungsmuster, wenn Matthiola-DNS bei Southern-Hybridisierung mit radioaktiv markierter pBR 322-DNS oder pLF 56-Insert-DNS inkubiert wird (Abb. 8, 9; 6), so daß diese Signale allein auf Hybridisierung der Matthiola-DNS mit pBR 322-Sequenzen beruhen. Bei der Reinigung der Insert-Sequenz von pLF 56 vom pBR 322-Anteil durch Saccharosegradienten-Zentrifugation bleiben stets pBR 322-Reste zurück. Da es nie zur Hybridisierung zwischen filtergebundener cDNS-Sequenz und ^{32}P-markierter pBR 322-DNS kommt, kann ausgeschlossen werden, daß beide Sequenzen homolog sind.

Die Stärke eines Hybridisierungssignals richtet sich nach der Homologie der hybridisierenden Sequenzen und nach der Menge der hybridisierenden DNS. Das Verhalten von pBR 322-DNS bei Hybridisierung von Matthiola-DNS läßt sich damit auf zwei Arten erklären: Die pBR 322-DNS ist stärker homolog zu einer in der Matthiola-DNS enthaltenen Sequenz als die cDNS aus Petersilie, oder sie besitzt zwar geringere Homologie zur Matthiola-DNS, die hybridisierenden Sequenzen sind aber in höheren Kopienzahlen vorhanden als die Chalkonsynthase-Gensequenzen.

Einen ersten Hinweis auf die Stabilität der Bindung zwischen Matthiola-DNS und Chalkonsynthase-spezifischer cDNS einerseits und pBR 322 andererseits ergab die Spot-Hybridisierung von Matthiola-DNS bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (Abb. 10). Erstaunlicherweise wird im Fall der ^{32}P-markierten pBR 322-DNS die stärkste Hybridisierung bei einer Temperatur von 60°C bei Zusatz von 5,3% Formamid (= 63,5°C ohne Formamid) erreicht, während der optimale Temperaturwert für pLF 56-Insert-DNS 5°C niedriger liegt. Die mit pBR 322 gebildeten Hybride sind also stabiler als die mit pLF 56-Insert-DNS gebildeten.
Dieses Ergebnis wurde durch Erstellung von Schmelzkurven der von Insert-DNS und pBR 322 mit DNS aus verschiedenen Organismen gebildeten Hybride bestätigt. Schmelzkurven decken auch geringe Sequenzunterschiede auf, und ein zu dem verwendeten Verfahren (2.6.) analoges wurde von Appels und Dvořák (1982) benutzt, um Homologiegrade in verschiedenen rDNS-Abschnitten bei verschiedenen Pflanzen festzustellen. Alle der Hybridisierung unterzogenen DNS-Spezies (E.coli mit pBR 322-DNS, pLF 56-Insert-DNS, Kalbs-, Antirrhinum- und Matthiola-DNS) binden pBR 322-DNS. Insert-DNS aus pLF 56 bindet pBR 322-Sequenzen, weil in der Insert-DNS-Präparation das Klonierungsplasmid als Verunreinigung vorhanden ist. Die absoluten Werte der durch eukaryontische DNS-Arten gebundenen Radioaktivität stimmen überein, und in ihrem Schmelzverhalten folgen sie mit nur leicht erniedrigtem T_m-Wert dem E. coli + pBR/pBR-Hybrid, es bildet sich eine typische Einkomponenten-Schmelzkurve. Bei Hybridisierung mit Insert-DNS besteht keine Einheitlichkeit mehr, deutlich unterscheiden sich die beiden Pflanzen-DNS-Arten von den anderen DNS-Proben. Bei ihnen lassen sich zumindest zwei pLF 56-Insert-DNS-bindende Komponenten unterscheiden, die bei unterschiedlichen Temperaturen die gebundene Radioaktivität freigeben. Eine DNS-Komponente, die gebundene Sequenzen erst bei Temperaturen über 90°C freisetzt, ist allerdings auch bei Kalbsthymus-DNS vorhanden und steht in Verbindung mit bei der eingesetzten eukaryontischen DNS gebundenen Radioaktivität, die auch bei 100°C nicht abschmilzt (Tab. 2). Diese Komponente wird wahrscheinlich von G/C-reichen DNS-Abschnitten gebildet, die die Oligo(dC)/(dG)-

Endabschnitte der Insert-DNS binden (vgl. Reimold et al., 1983). Pflanzenspezifisch, und damit charakteristisch für die Reaktion der Chalkonsynthase-Gensequenz, ist das Abschmelzen einer pLF 56-Insert-Komponente bei niedrigen Temperaturen. Dies stimmt überein mit der zuvor bei Spot-Hybridisierung gemachten Beobachtung, daß pBR 322/Matthiola-Hybride stabiler sind als cDNS/Matthiola-Hybride.
Inzwischen liegt die gesamte Sequenz dreier cDNS-Klone aus Petersilie (pLF 12, pLF 15 und pLF 56) vor (Reimold et al., 1983). Sie zeigt, daß pLF 56-Insert-DNS neben Oligo(dC)- und Oligo(dG)-Enden auch Oligo(dA)-Abschnitte enthält. Am 3'-Ende des Inserts befinden sich 220 bp nicht codierender Sequenz, so daß für pLF 56-Insert ca. 1000 bp codierender Bereich bleiben, für pLF 12-Insert cà. 300 bp.
Da nicht codierende Genbereiche zwischen verschiedenen Spezies stark variieren können (z.B. die Bereiche der nicht transkribierten Spacer von rDNS, Appels und Dvořák, 1982a), kann nur für diese ca. 300 bp vom pLF 12 eine Homologie zum Chalkonsynthase-Gen von Matthiola erwartet werden. Spezifische Basenpaarung erscheint daher unwahrscheinlich.
Der G/C-Gehalt der pLF 56-Insert-DNS beträgt (unter Ausschluß der Oligo(dC)/(dG)-Endsequenzen) 47,3%. Berücksichtigt man die durchschnittliche Fragmentgröße (650 bp), ergibt sich bei den verwendeten Hybridisierungsbedingungen (II und III) ein T_m-Wert von 93,6°C bzw. von 86,9°C bei 1 x SSC. Da die bei niedrigen Temperaturen abschmelzende DNS-Komponente bei Spot-Hybridisierung von Matthiola- und Antirrhinum-DNS einen T_m-Wert kleiner 70°C besitzt (eine genaue Bestimmung ist aus diesem Experiment nicht möglich), deutet dies auf Sequenzhomologie zwischen den genomischen Chalkonsynthase-Genen von Matthiola bzw. Antirrhinum und der cDNS von Petersilie von weniger als 83% hin. Die in Abb. 11C und 11D dargestellten Kurven zeigen, daß die Chalkonsynthase-spezifische Hybridkomponente von Antirrhinum etwas stabiler ist als die von Matthiola.
Über die Herkunft der pBR 322-artigen Sequenzen in Matthiola-DNS läßt sich nur spekulieren. Die Variation der Hybridisierungsintensität bei einzelnen DNS-Präparationen und das Auftreten distinkter Banden auch bei unvollständig abgebauter DNS

deuten darauf hin, daß sie von Organellen-DNS gebildet werden. Ergebnisse von Bremer (1983) zeigen verstärkte Hybridisierung bei Chloroplasten-DNS. Gegen diese These spricht, daß Hybridisierung auch bei aus Blüten-Zellkernen isolierter DNS auftritt. Da die Kerne in 0,5% Triton X-100 präpariert und gewaschen wurden, kann Organellen-DNS nur einen verschwindenden Anteil der gesamten DNS ausmachen.
Die Hybridisierung mit pBR 322 könnte auch in der Verunreinigung der Pflanzen-DNS mit im Labor benutzten pBR 322-Abkömmlingen ihren Ursprung haben. Dagegen spricht die Größe einzelner hybridisierender DNS-Fragmente (z.B. die Bam HI-Bande von ca. 7 kbp; die Größe von pBR 322 beträgt 4,3 kbp, die von pBR 325 5,2 kbp und die von pLF 56 5,7 kbp) und das mit Eco RI gefundene Schneidemuster: Alle benutzten Plasmide besitzen nur eine Schnittstelle für Eco RI (Bolivar und Rodriguez, 1975; Bolivar, 1978; eigenes Ergebnis , vgl. Abb. 3) und können deshalb auch unter Berücksichtigung der Laufeigenschaften von "supercoil", zirkulärer und geschnittener Plasmid-DNS bei Gelelektrophorese nicht das gefundene Muster bilden. Kreuzhybridisierung von pBR 322 mit eukaryontischer DNS wird in der Literatur nicht beschrieben, doch wird sie bei verschiedenen Pflanzen in unterschiedlicher Stärke beobachtet (A.J.Bendich, pers. Mitteilung über V.Hemleben) und wird auch bei tierischer DNS gefunden (C.Menne, pers. Mitteilung).
Trotz der gefundenen festen Bindung von pBR 322-DNS an Matthiola-DNS (T_m-Wert 79°C in 1 x SSC) läßt sich nicht für alle bei der Hybridisierung aufleuchtenden Banden ausschließen, daß sie durch einen unspezifischen Mengeneffekt markiert werden. Versuche mit Hind III-abgebauter Phagen-DNS zeigen, daß solch ein Effekt auftritt (Abb. 16). Hybridisierende Matthiola-Banden im niedermolekularen DNS-Bereich lassen sich mit im Gelbild sichtbaren Banden repetitiver DNS in Übereinstimmung bringen, höhermolekulare DNS wird jedoch nicht aufgrund ihrer Mengenverteilung markiert (Abb. 16). Der Mengeneffekt ist also in jedem Fall nur eine mögliche Komponente, die zur Hybridisierung beiträgt, die wichtigere wird von der DNS-Sequenzhomologie gebildet.

Das Schmelzverhalten der Matthiola/pLF 56-Insert-Hybride zeigt eine spezifische Bindung des Chalkonsynthase-Gens. Diese Interpretation wird durch Ergebnisse von Jantzen (1983) gestützt, er konnte die Zunahme von Chalkonsynthase-mRNS in definierten Stadien der Blütenentwicklung durch Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS nachweisen. Bei der DNS/DNS-Hybridisierung ist aber eine Aussage über die genomische Gensequenz von Matthiola erst möglich, wenn die Hybridisierung der zu pBR 322 homologen Sequenzen ausgeschlossen wird. Dies wurde dadurch versucht, daß die pLF 56-Insert-DNS aus einem Agarosegel eluiert wurde. Gelelektrophorese erlaubt eine schärfere Auftrennung von DNS-Größenklassen als eine Saccharosegradienten-Zentrifugation; eine Auftrennung der beiden durch Pst I-Abbau gebildeten Fragmente ist möglich (0,8 kbp und 0,5 kbp). Es wurde versucht, die Menge zur Hybridisierung eingesetzter Chalkonsynthase-spezifischer Sequenzen zu steigern, indem das kleinere Insert-Fragment isoliert wurde. Es enthält den am 5'-Ende des Gens gelegenen Teil der cDNS (Kreuzaler et al., 1983). Abb. 9 zeigt, daß durch dieses Verfahren keine Veränderung der Hybridisierungsantwort erreicht wurde.

Zugabe unmarkierter DNS als Kompetitor während der Hybridisierung ist eine weitere Möglichkeit, unerwünschte Hybridisierung auszuschließen. Die Ergebnisse der Sättigungshybridisierung (Tab. 2) zeigen, daß die Bindung von pBR 322-DNS durch Matthiola-DNS auch nicht verhindert wird, wenn ein 100facher Überschuß an unmarkiertem Plasmid zugegeben wird. Auch Zusatz von Poly(C) zum Hybridisierungsmedium, um Bindung der Insert-DNS an G/C-reiche DNS-Abschnitte auszuschließen, zeigt keinen Effekt auf das Hybridisierungsergebnis. Diese Ergebnisse sind dadurch bedingt, daß Dextransulfat im Hybridisierungsmedium die Ausbildung netzartiger DNS-Strukturen begünstigt. Netze unmarkierter DNS fangen aber auch radioaktiv markierte DNS ein.

Der Versuch, radioaktiv markierte pBR 322-DNS mit filtergebundener Plasmid-DNS auszusondern und die Hybridisierungslösung erst danach zur Hybridisierung von Matthiola-DNS einzusetzen, wurde nur einmal durchgeführt. Dabei wurde die Markierung der pBR 322-Bande des als Hybridisierungsstandard benutzten, Pst I-

geschnittenen Plasmids nicht verhindert, die radioaktiv markierte pBR 322-DNS also nicht völlig entfernt (Ergebnis nicht dargestellt). Die abweichenden T_m-Werte des Chalkonsynthase-spezifischen DNS-Anteils und des pBR 322-Anteils der Insert-DNS-Präparationen läßt die Möglichkeit offen, durch Optimierung der Hybridisierungsbedingungen auf die cDNS-Sequenz ihre Hybridisierung zu verstärken.

Im Spot-Hybridisierungsexperiment gab es unter Hybridisierungsbedingungen III (5,3% Formamid im Medium, Hybridisierung bei 55°C) die stärkste Reaktion mit Insert-DNS. Unter diesen Bedingungen ausgeführte Experimente ergaben keine neuen, Chalkonsynthase-spezifischen Hybridisierungsbanden (Abb. 12); direkter Vergleich der Ergebnisse bei beiden Hybridisierungstemperaturen ergab keinen Unterschied (Abb. 13).

Antirrhinum-DNS zeigt bei Aufnahme der Schmelzkurve des mit pBR 322 gebildeten Hybrids kein von dem der Matthiola-DNS gravierend abweichendes Verhalten, im Gegensatz zur Matthiola-DNS gelang es aber, Chalkonsynthase-spezifische Gensequenzen von Antirrhinum mit pLF 56-DNS zu identifizieren (Wienand et al., 1982; Saedler et al., 1982). Deshalb wurde das Hybridisierungsverhalten von mit Eco RI geschnittener, elektrophoretisch aufgetrennter und nach Southern auf Nitrozellulosefilter transferierter Matthiola- und Antirrhinum-DNS gegenübergestellt. Zusätzlich wurde Petersilien-DNS, die homologe DNS-Probe, als Vergleich herangezogen. Nach Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS leuchten für alle DNS-Arten Banden auf (Abb. 12, 14); am schwächsten ist die Hybridisierung von Matthiola-DNS (Abb. 14). Die Größe der Petersilien-Bande (4,5-4,6 kbp) stimmt gut mit den von Wienand et al. (1982) bestimmten Werten überein. Allerdings hybridisiert eine Bande von 1,5 kbp stark, die zwar auch bei ihnen auftritt, der sie jedoch keine Bedeutung zumessen. Antirrhinum-DNS zeigt übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wienand et al. eine hybridisierende Bande von etwa 2 kbp; die von ihnen als Wildtyp-DNS (Handelssorte Tip Top Karmesin) eingesetzte DNS weist eine stark hybridisierende Bande von 5,7 kbp auf, dagegen leuchten bei beiden hier eingesetzten Antirrhinum-Linien (1 und 4) Banden bei 4,6 kbp und 3,6 kbp auf. Sie glei-

chen damit eher der von Wienand et al. (1982) eingesetzten Antirrhinum-Mutante T53, die ein Insertionselement enthält, das so in das 5,7 kbp-Fragment integriert ist, daß zwei Eco RI-Fragmente von 4,7 und 4,5 kbp entstehen. Da sich die zur DNS-Isolierung benutzten Pflanzen genetisch unterscheiden, kann das gefundene, von den Ergebnissen von Wienand et al. abweichende Schneidemuster durch Polymorphismus der Eco RI-Schnittstellen im Chalkonsynthase-Gen erklärt werden.

Das bei dieser Hybridisierung auftretende Bandenmuster der Matthiola-DNS entspricht dem "pBR 322-Hybridisierungsmuster" dieser DNS. Es stellt sich deshalb die Frage, ob auch ein Teil der bei Hybridisierung von Antirrhinum-DNS auftretenden Banden durch Hybrid-Bildung mit pBR 322 entstanden ist. Mehrere Hybridisierungsansätze von Antirrhinum-DNS mit pBR 322 erbrachten keinen Hinweis für diese Annahme; Antirrhinum-DNS zeigte bei Hybridisierung mit pBR 322 keine distinkten Banden, sondern lediglich unspezifische Hintergrundschwärzung (Abb. 15). Antirrhinum-DNS weist also stärkere Homologie zur Chalkonsynthase-cDNS aus Petersilie auf als Matthiola (dies findet Ausdruck in einer der Petersilien-DNS vergleichbaren Stärke der Hybridisierung transferierter DNS und in einer höheren Stabilität des pflanzenspezifischen Teils der mit pLF 56-Insert-DNS gebildeten Hybride im Vergleich mit Matthiola-DNS). Gleichzeitig bindet pBR 322 nur unspezifisch an Antirrhinum-DNS, während Matthiola-DNS Sequenzen aufweist, die bevorzugt pBR 322 binden. Wie bei Matthiola konnte auch mit aus Mais isolierter DNS keine oder nur schwache Reaktion mit pLF 56-Insert-DNS bei Southern-Hybridisierung festgestellt werden. Die Ergebnisse von Klonierungsversuchen bei Mais zeigen, daß unter solchen Umständen die Gefahr steigt, Hybridisierungssignale von Chalkonsynthase-unspezifischen Teilsequenzen zu überschätzen; die mit pLF 56-Insert-DNS identifizierten genomischen Klone wiesen Homologie zu den Poly(dC)/(dG)-Enden auf (Wienand et al., 1982; Saedler et al., 1982). Ergebnisse über Kreuzhybridisierung von pLF 56 mit anderen Pflanzen, etwa der Petunie, liegen noch nicht vor. Unterschiedliche Kreuzhybridisierung tritt auch bei Sequenzen anderer Gene auf, obwohl sich die codierten Proteine gleichen.

So erfolgt keine Kreuzreaktion der cDNS des Casein-Gens von Maus mit der DNS-Sequenz der Ratte (Gupta et al., 1982). Bei Pflanzen zeigen Untersuchungen der cDNS der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase von Weizen und Erbse unterschiedlich starke Kreuzreaktion mit Weizen, Gerste, Erbse, Glycine und Petunie (Smith et al., 1983). Besonders ausgeprägte Sequenzunterschiede bestehen zwischen Monocodyledonen- und Dicotyledonen-codierten Sequenzen. Während aber die cDNS aus Weizen mit Petunie schwach hybridisiert, kommt es mit Erbse und Glycine zu keiner Reaktion. cDNS aus Erbse reagiert gleich schwach mit der verwandten Glycine wie mit Petunie, so daß auch nahe evolutionäre Beziehungen keine Gewähr für den Erhalt der Nukleotid-Sequenzen von Proteinen gleicher Funktion bieten. Dies ist dadurch bedingt, daß Selektionsdruck lediglich für die codierte Aminosäure-Sequenz besteht, und zahlreiche stille Mutationen zwar die Nukleotid-Folge, nicht aber die Aminosäure-Sequenz ändern. Im allgemeinen ist die Homologie von Proteinen größer als die der codierenden Genbereiche. Nur in wenigen Ausnahmen wurde stärkere Übereinstimmung der Nukleotid- als der Aminosäure-Sequenz gefunden: bei den κ-Ketten-Domänen der Immunglobulingene der Ratte (Sheppard et al., 1981) und für Speicherproteine der Leguminosen (Schuler et al., 1983). Dagegen fanden Cooper und Crain (1982) bei Vergleich der Aminosäure-Sequenz des Actingens von Drosophila, Hefe und Seeigel eine Abweichung von 5,6-11,5%, während die Nukleotid-Sequenz Veränderungen von 17-34% aufwies. Ähnliche Werte liegen für den Vergleich der Lactalbumingene von Säugern vor (Hall et al., 1981).
Die mit Hilfe der cDNS aus Dictyostelium isolierten Actingene von Mais und Glycine zeigen wenig Übereinstimmung in der Nukleotid-Sequenz (Shah et al., 1983). Die Kapazität an stillen Mutationen wurde voll ausgenutzt, zusätzlich bestehen Unterschiede, die durch Mutationen mit Einfluß auf die Aminosäure-Sequenz hervorgerufen wurden (Replacement-Mutationen). Der Wert für Replacement-Mutationen bei Vergleich zwischen Pflanzen und Tieren liegt bei 14%, innerhalb der untersuchten Tierspezies beträgt der Maximalwert 6%, zwischen den untersuchten Pflanzen liegt dieser Wert bei 10%. Da Actine in Pflanzen und Tieren ähnliche Funktionen haben, ist dieses Ergebnis nicht damit zu erklären,

daß in Tieren und Pflanzen ein unterschiedlicher Selektionsdruck besteht. Die Ergebnisse von Shah (1983) und Ergebnisse von Hylding-Nielsen et al. (1982) am Leghämoglobingen von Phaseolus deuten darauf hin, daß bei Pflanzen v.a. die Lage von Intronsequenzen, nicht so stark aber die Nukleotid-Sequenz konserviert wird. Vorhandene immunologische Kreuzreaktion von Proteinen bietet also keine Gewähr für die Kreuzhybridisierung von DNS-Sequenzen. Die Fähigkeit zur Kreuzreaktion bei Hybridisierung kann zwischen verschiedenen Pflanzen verschieden groß sein und hängt nicht unbedingt von ihrer evolutionären Verwandtschaft ab.
Die bei Matthiola-DNS gefundenen Ergebnisse fügen sich in dieses Bild ein. Die Schmelzkurven der Hybride von Pflanzen-DNS und pLF 56-Insert-DNS (Abb. 11) deuten daraufhin, daß Hybridisierung zwischen Petersilie-cDNS und dem Chalkonsynthase-Gen von Matthiola stattfindet, die Homologie aber schwächer ausgeprägt ist als bei dem Gen von Antirrhinum.
Eine Aussage über die Struktur des Chalkonsynthase-Gens bei Matthiola und Hinweise auf die Art der Mutation bei der Linie 18 sind mit der in pBR 322 klonierten cDNS von Petersilie nicht möglich.

Die genaue Charakterisierung eines Gens ist erst möglich, wenn es kloniert vorliegt. Auch bei geringer Sequenzhomologie von Hybridisierungsproben ist die Identifizierung von DNS-Sequenzen möglich, wenn diese angereichert vorliegen. Klonierung in Plasmiden oder Phagen dient der Anreicherung von definierten DNS-Sequenzen; deshalb ist es legitim, ein Screening von Plasmid- oder Phagen-Klonen auch mit Nukleinsäureproben geringerer Homologie durchzuführen (vgl. Wienand et al., 1982).
Es bestehen zwei Möglichkeiten, ein bestimmtes Gen zu isolieren:
- Die Anreicherung seiner Sequenz und gezielte Klonierung.
- Die Erstellung einer "Bibliothek", die alle DNS-Sequenzen des untersuchten Objekts in einem Vektorsystem enthält, und die Isolierung eines definierten Gens aus dieser Menge rekombinanter DNS-Moleküle.

Die Anzahl N rekombinanter Klone, die bei einem Organismus eine Bibliothek der genomischen DNS bilden, hängt von der Genomgröße

und von der durchschnittlichen Größe der integrierten DNS ab. Sie wird berechnet als N = ln (1-p)/ln (1-f), wobei p die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens des DNS-Fragments in der Genbank und f den Anteil dieses Fragments im Genom bezeichnet (Clarke und Carbon, 1976). Damit hängt die Anzahl N der Klone, die notwendig sind, um eine DNS-Bibliothek zu erstellen, auch vom Klonierungssystem ab. Tabelle 15 zeigt, daß Klonierung in Plasmiden ohne Anreicherung bestimmter DNS-Sequenzen hohe Klonzahlen voraussetzt. Vor Klonierung im Plasmid-System ist deshalb eine Vorauswahl von DNS-Sequenzen hilfreich.

Tabelle 15: Anzahl der rekombinanten Moleküle, die eine Matthiola-DNS-Bibliothek ausmachen, in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Größe integrierter Matthiola-DNS.

durchschnittliche Fragmentgröße	Anzahl rekombinanter Klone	möglicher Vektor
5 kbp	$13{,}6 \times 10^5$	Plasmide, λgtWES
10 kbp	$6{,}8 \times 10^5$	λNM 762, λEMBL 3A, λgt WES
15 kbp	$4{,}5 \times 10^5$	λNM 762, λEMBL 3A
20 kbp	$3{,}4 \times 10^5$	λEMBL 3A

Eine DNS-Sequenz kann angereichert werden, wenn ihre Lage im Gradienten oder bei Gelelektrophorese bestimmt werden kann. Beispiele für definierte Sequenzen, die von der übrigen DNS abgetrennt werden können, sind rDNS und Satelliten-DNS. Nach Dichtegradienten-Zentrifugation kann hier weitgehend einheitliche DNS zur Klonierung eingesetzt werden (z.B. Gerlach et al., 1979; Schiebel, 1984; Deumling, 1981; Hemleben et al., 1982; Ganal, 1984). Die Lage bestimmter Sequenzen kann aber auch mit Hilfe einer Hybridisierungsreaktion festgestellt werden. Page et al. (1981) reicherten die Gensequenz des Wachstumshormons der Ratte durch Saccharosegradienten-Zentrifugation und Identifizierung der das Gen enthaltenden Fraktionen durch Hybridisierung mit Hormon-codierender mRNS 100fach an. Ein analoges Verfahren, bei dem die Auftrennung der Restriktionsfragmente durch Chromatographie erfolgte (RPC 5-Säule), wurde zur Klonierung des Ovalbumingens (Woo et al., 1978) und des Globin-

gens der Maus (Tilghman et al., 1977) angewandt. Im Fall des Ovalbumingens genügten 20 000 untersuchte Phagenklone, um 5 positive Klone zu erhalten.
Diese Ergebnisse zeigen, daß Selektion einer Sequenz den Aufwand ihrer Klonierung beträchtlich verringert. Zur Klonierung des Chalkonsynthase-Gens von Matthiola wurde deshalb ein zum von Page angewandten Verfahren analoger Versuchsansatz mit Vorselektion auf Saccharosegradienten eingesetzt.
Drei Größenklassen Hind III-abgebauter DNS wurden durch Hybridisierung mit pLF 56-DNS markiert (Abb. 17). Pro eingesetztem µg Vektor-DNS (pBR 325) wurden ca. 1000 x mehr rekombinante Klone erhalten, wenn diese durch einen Saccharosegradienten zentrifugierten DNS-Fragmente zur Ligation eingesetzt wurden, als wenn unfraktionierte DNS verwendet wurde (Tab. 3). Dies ist auf effizientere In-vitro-Ligation zurückzuführen, sie wird beeinflußt durch das Verhältnis von Vektor- und Fremd-DNS und von der Länge der eingesetzten Fremd-DNS. Im allgemeinen wird die Konzentration dieser DNS höher gehalten als die des Vektors. Tab. 3 zeigt, daß die größten Ausbeuten erreicht wurden, wenn das Vektor-/Matthiola-DNS-Verhältnis kleiner als 1 war. Da das Plasmid hier durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase keine Selbstligation ausführen kann, wird u.U. bei höherer Matthiola-DNS-Konzentration die interne Ligation begünstigt.
Die Klonierungseffizienz pflanzlicher DNS kann 10^2-10^3 x niedriger sein als die tierischer DNS (Panopoulos, 1982). Dafür werden Verunreinigungen der DNS mit Polysacchariden verantwortlich gemacht und Zentrifugation der DNS über EtBr enthaltende CsCl-Gradienten empfohlen. Ein damit vergleichbarer Reinigungseffekt wird durch Actinomycin D-CsCl-Gradienten erreicht. Die DNS in Gradient I (Abb. 17, Tab. 3, Fraktionen A und B) wurde zusätzlich über Actinomycin D-CsCl-Gradienten gereinigt, zeigte aber keine erhöhte Transformantenausbeute im Klonierungsansatz. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die nur über einen CsCl-Gradienten gereinigte DNS (Gradienten II-IV, Abb. 17) durch die anschließende Saccharosegradienten-Zentrifugation eine ausreichende Reinigung erfuhr.
Keiner der mit vorselektionierter DNS gebildeten Klone gab mit

Insert-DNS aus pLF 56 ein positives Hybridisierungssignal. Da die Zahl der untersuchten Klone (theoretisch 100 000, tatsächlich wohl weniger, da viele Klone, die ihre Tetracyclinresistenz verloren hatten, dennoch keine Insert-DNS enthielten) eine große Wahrscheinlichkeit bietet, eine angereicherte DNS-Sequenz zu isolieren (nimmt man die Werte von Woo et al., 1978, als Grundlage), muß angenommen werden, daß durch die Vorselektion die gesuchte Sequenz nicht erfaßt wurde.
Im Phagen-System ist die Klonierung von DNS-Fragmenten ohne vorherige Anreicherung über "DNS-Bibliotheken" möglich. Die Eignung eines Klonierungsphagen zur Erstellung einer Genbank wird bestimmt von der Größe der Fremd-DNS, die integriert werden kann. Tabelle 16 zeigt Beispiele für Klonierungssysteme, die zur Klonierung von Pflanzengenen eingesetzt wurden, und die gefundenen Klonierungseffizienzen. Diese Effizienzen stimmen weitgehend mit den theoretisch bestimmten überein. Die für Matthiola errechneten Werte von 3,4-6,8 x 10^5 Klonen (Tab. 15) zeigen, daß eine möglichst hohe Klonierungsrate erreicht werden muß.

Tabelle 16: Klonierungseffizienzen.

Gen	Bemerkungen	Pflanze	Phage/ Fragmentgröße	Anzahl Phagen	positive Phagen	Autor
Actin	unique	Soja Mais	λCharon4A 15-20kbp	$4x10^5$ $1x10^5$	40 10	Shah, 1983
Histon	repet.	Weizen	λCharon4 12-24kbp	$1x10^5$	3	Tabata, 1983
Lectin	unique	Glycine	λCharon4 16kbp	$2x10^6$	2	Goldberg,1983
Phaseolin	Genfamilie	Phaseolus	Charon24A 8-20kbp	$2x10^6$	12	Sun, 1981
cin-Element	repet.	Mais	λgtWES 2-20kbp	$5x10^3$	14	Gupta, 1983a
Zein	Genfamilie	Mais	λgtWES 2-20kbp	$3x10^4$	1	Wienand, 1981
CHS	unique	Petersilie Antirrhin.	λgtWES 2-20kbp	$3x10^5$ $1x10^6$	6 (1) 5 (2)	Wienand, 1982
Waxy-Locus	unique	Mais	λEMBL 4	$1x10^5$	2	Shure, 1983

Einen wesentlichen Punkt, der die Ausbeute rekombinanter Phagen beeinflußt, bildet die Qualität der In-vitro-Verpackungsextrakte und die Effizienz der In-vitro-Verpackung. Die entwickelten Verfahren (2.4.2.1., 2.4.2.3.) führten zu Ausbeuten von mehr als 10^7 pfu pro µg eingesetzter ungeschnittener Vektor-DNS; Verpackungseffizienzen dieser Größenordnung werden auch von Murray et al. (1977), Hohn (1979) und Zehnbauer und Blattner (1982) beschrieben.

Ziel der Ligation ist es, Fremd-DNS und Phagen-Armfragmente so zu verbinden, daß Konkatemere entstehen, die zwischen den cos-Enden der Phagen 38-51 kbp DNS integriert haben (Zehnbauer und Blattner, 1982). Die Bildung dieser Strukturen ist abhängig vom Verhältnis von Phagen-DNS-Fragmenten und Fremd-DNS, von der DNS-Konzentration im Ligationsansatz und von den Temperaturbedingungen, unter denen die Ligation abläuft. Die besten Phagenausbeuten wurden erreicht, wenn Phagenarm-DNS:Matthiola-DNS-Verhältnisse von 2:1 bis 3:1 und Gesamt-DNS-Konzentrationen von 100-150 µg eingestellt wurden. Diese Werte entsprechen den von Dugainzcyk et al. (1975) errechneten. Wurde partiell mit Restriktionsenzymen abgebaute, größenselektionierte DNS der Größenklassen 6-9 kbp und 9-20 kbp zur Ligation eingesetzt, steigerte sich die Phagenausbeute gegenüber dem Einsatz einer vollständig restriktionsverdauten DNS 3-20fach. Ähnliches wird von Shure et al. (1983) beobachtet. Wesentlich für die Bildung in vitro verpackbarer DNS bei Ligation ist die Güte der Phagen-DNS, vor allem müssen die Einzelstrang-DNS-Bereiche, die cos-Enden, intakt vorhanden sein.

Die Ausbeuten von Phagen nach In-vitro-Ligation und -Verpackung lagen bei 300-16 000 pfu/µg Vektor-Arm-DNS. Beschrieben sind Werte von 10^5-10^4 Phagen pro µg Vektor-DNS. Einsatz von zusätzlich über EtBr-enthaltenden CsCl-Gradienten gereinigter Matthiola-DNS brachte keine Steigerung der Ausbeuten.

Da nur ca. 1 von 10^3 Phagenarm-Paaren in vitro so ligiert wird, daß verpackbare DNS entsteht (Zehnbauer und Blattner, 1982), haben bei Elektrophorese nicht mehr nachweisbare Mengen ungeschnittener Phagen-DNS einen hohen Hintergrund von ursprünglichen Klonierungsphagen zur Folge. Um den Anteil ungeschnittener

Phagen-DNS zu verringern, wird vorgeschlagen, die Phagen-DNS zweimal hintereinander mit Enzymüberschuß abzubauen (Frischauf et al., 1983 ; H.Biessmann, pers. Mitteilung) oder zusätzlich zum Abbau mit dem Klonierungsenzym mit einem Restriktionsenzym zu schneiden, das nur eine Schnittstelle im Phagen-Mittelfragment besitzt (Maniatis, 1982).
Ein im Verpackungstest sichtbarer Hintergrund ungeschnittener DNS (Phagen λNM 762, λEMBL 3A) konnte weder durch zweifache Inkubation der Phagen-DNS mit Restriktionsenzym noch durch die Anwendung von zwei Restriktionsenzymen (λEMBL 3A, Bam HI und Eco RI) entfernt werden. Der Anteil nicht abgebauter DNS hing augenscheinlich mit der Art der DNS-Präparation zusammen: mit Formamid isolierte DNS (2.2.3.4.2.) zeigte einen geringeren Anteil ungeschnittener Phagen-DNS als DNS, die mit anderen Präparationsmethoden erhalten wurde (2.2.3.4.). Werte für λNM 762 liegen nicht vor.
Bei Replacement-Phagen können auch bei In-vitro-Ligation ursprüngliche Klonierungsphagen entstehen, wenn das Phagen-DNS-Mittelfragment im Ligationsansatz vorhanden ist. Das Mittelfragment des Phagen λNM 762 wurde vollständig durch die Verbindung der Phagenarmfragmente über die cos-Enden und anschließende Saccharosegradienten-Zentrifugation entfernt (Abb. 22); beim EMBL-Phagen 3A geschah dies durch biochemische Selektion (2.3.5.1.).
Im System λgtWES wurden 200 000 Klone gebildet; sie wurden mit pLF 56-Insert-DNS hybridisiert (dies wurde im Labor von Dr. U.Wienand, MPI für Züchtungsforschung, Köln, Abt. Saedler ausgeführt). Keiner der Phagen gab eine positive Antwort. Über den Prozentsatz rekombinanter Moleküle und die Größe der integrierten DNS gibt es keine Werte. Die Größe in λgtWES integrierter Sequenzen, die das Cin-Element von Mais enthalten, liegt zwischen 2,4 und 9,8 kbp, der Durchschnittswert von 14 Klonen bei 6,8 kbp (Gupta et al., 1984). Diese rekombinanten Phagen wurden unter den gleichen Bedingungen gebildet wie die Matthiola-DNS-enthaltenden Phagen im Vektor λgtWES. Eine direkte Übertragung der Werte ist jedoch nicht möglich, da die Größe der integrierten DNS von der selektionierten DNS (dem Cin-Element) abhängen

kann. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß Matthiola-DNS größer 10 kbp integriert wurde. Unter diesen Bedingungen ist das Auftreten eines Klons, der Chalkonsynthase-Sequenzen enthält, bei 200 000 Phagen noch nicht zu erwarten.
Nach Isolation und Charakterisierung der DNS aus verschiedenen Phagen, die bei Klonierung mit λNM 762 entstanden, zeigte es sich, daß nur ca. 1/3 der Phagen rekombinant war, die Größe integrierter DNS lag unter 10 kbp. Nimmt man diese Werte zusammen, kann bei insgesamt 300 000 untersuchten Phagen, wie im Fall des Phagen λgtWES, das Ausbleiben eines Hybridisierungssignals bei Hybridisierung mit pLF 56-Insert-DNS auf die zu geringe Anzahl untersuchter rekombinanter Phagen zurückzuführen sein.
Die für diese Klonierung benutzte λNM 762-DNS wurde parallel von Schiebel (1984) zur Klonierung gereinigter rDNS aus Phaseolus eingesetzt, allerdings lag die Ausbeute rekombinanter Phagen niedrig, berücksichtigt man, daß eine fast einheitliche DNS-Probe zur Ligation eingesetzt wurde. Dies deutet darauf hin, daß auch hier ein Hintergrund unveränderter Klonierungsphagen vorlag.
Als Klonierungsphage für genomische Bibliotheken hat der Phage λNM 762 den Nachteil, daß die Präparation von Phagen-Armfragmenten (DNS-) Material- und Zeit-aufwendig ist, daß keine weitere Möglichkeit besteht, den Anteil ungeschnittener Phagen-DNS zu verringern, etwa durch Abbau mit einem zweiten Restriktionsenzym, und daß Hind III das einzig mögliche Klonierungsenzym ist. Es gibt kein mit Hind III kompatibles,4 bp erkennendes Restriktionsenzym, und somit kann eine weitgehend statistische Verteilung aller DNS-Sequenzen auf Fragmente klonierbarer Größe weder durch vollständigen noch durch unvollständigen Abbau der DNS erreicht werden.
Alle diese Nachteile sind beim Phagen λEMBL 3A ausgeschaltet. Neben den bereits erwähnten Vorteilen in bezug auf die Größe integrierbarer DNS und den Ausschluß von Selbstligation kann die Klonierung in diesem Phagen über die Enzyme Sal I, Bam HI, Eco RI und Sau 3A erfolgen. Damit dürfte keine DNS-Sequenz auf Grund der Verteilung von Restriktionsstellen von der Klonierung in λEMBL 3A ausgeschlossen sein.

Um zu testen, ob diese theoretischen Vorteile auch in seiner praktischen Anwendung bestehen, wurden 150 000 mit λEMBL 3A gebildete Phagen mit Gesamt-RNS aus Matthiola-Blüten hybridisiert (Linie 04, Stadium I,II). Gesamt-RNS enthält ca. 85% rRNS, und die rDNS von Matthiola macht rund 0,5% der Matthiola-DNS aus (Grierson und Hemleben, 1977). Die Mehrzahl der Phagen, die eine Hybridisierungsantwort geben, hat deshalb rDNS integriert. Ein Vergleich der theoretisch erwarteten Anzahl an Phagen, die rDNS enthalten, mit der Zahl Phagen, die eine Hybridisierungsantwort geben, gibt damit ein Maß für die Klonierungseffizienz des Systems. Die Anzahl der mit Gesamt-RNS hybridisierenden Phagen stimmt mit dem erwarteten Wert für rDNS-enthaltende Phagen überein (390 positive Klone aus 150 000 Phagenklonen); die Größe integrierter DNS liegt zwischen 13 und 20 kbp; 3,4-4,5 x 10^5 rekombinante Phagen würden also das gesamte Matthiola-Genom repräsentieren.

Die 150 000 gebildeten Phagen müssen auch Poly(A)$^+$-RNS-codierende Sequenzen enthalten. Solche DNS macht rund 4,6% der Gesamt-DNS von Tabak aus (Kamalay und Goldberg, 1980); Abschätzungen für andere Pflanzen liefern ähnliche Werte (Wenzel und Hemleben, 1982a,b). Maximal 10 000 bis 14 000 unterschiedliche Transkripte werden in einer Zelle gefunden, sie werden von ca. 2% der DNS abgelesen. 2% dieser Transkripte sind mit mehr als 5 Kopien pro Zelle vertreten (Kamalay und Goldberg, 1980; Wenzel und Hemleben, 1982b). Nur diese abundante mRNS macht einen ausreichenden Anteil der Poly(A)$^+$-RNS aus, um ein erkennbares Hybridisierungssignal zu geben. Abundant in der Poly(A)$^+$-RNS sind aber auch bei 99%iger Reinigung die rRNS-Arten. Dadurch, daß die komplementäre rDNS im Genom gegenüber den unikalen Sequenzen von Strukturgenen überrepräsentiert ist, ist die Identifizierung von rDNS enthaltenden Phagenklonen auch mit Poly(A)$^+$-RNS wahrscheinlich.

Hybridisierung von 70 000 Phagen mit Poly(A)$^+$-RNS ergab 12 Signale, wovon sich 6 auch im folgenden Hybridisierungsschritt als positiv erwiesen: die zugrunde liegenden Phagen enthielten rDNS. Dies zeigt, daß auch bei Hybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNS große Klonzahlen vorhanden sein müssen, damit es wahrscheinlich wird,

zu mRNS komplementäre Sequenzen in den rekombinanten DNS-Molekülen zu finden.
Die rDNS-enthaltenden Phagen λEM 19/1012 und λEM 16/1411 wurden einer Analyse durch Restriktionsabbau unterzogen. Sie enthalten 17,5 und 15,6 kbp integrierte DNS. Diese Größe reicht aus, um ca.2 Matthiola-rDNS-Hind III-Repetitionseinheiten von 7,4 kbp zu integrieren. In keinem der Phagen wurde jedoch ein vollständiger rDNS-Repeat kloniert. Der Phage λEM 19/1012 hat vermutlich ein rDNS-Element integriert, das in der 18S-RNS-Region eine Hind III-Schneidestelle trägt. Diese Hind III-Schneidestelle tritt im genomischen Hind III-Repeat von Matthiola vermutlich nicht auf; sie könnte in der genomischen DNS durch Methylierung verdeckt sein.
Die klonierte rDNS des Phagen λEM 19/1012 läßt sich mit der von Jantzen (1983) aufgestellten Karte in Übereinstimmung bringen. Diese Übereinstimmung und die Hybridisierung mit rRNS enden nahe einer Bam HI-Schneidestelle der genomischen Matthiola-DNS, die selbst eventuell durch In-vitro-Ligation mit einem weiteren Sau 3A-geschnittenen Matthiola-DNS-Fragment im Phagen-Insert zerstört wurde. Die zusätzlich in der klonierten rDNS auftretende Bam HI-Schneidestelle kann in der genomischen DNS durch Methylierung verdeckt sein.
Auch der Phage λEM 16/1411 enthält keine vollständige rDNS-Repetitionseinheit. Während die gesamte 25S-rRNS-Region vorhanden zu sein scheint, fehlt die 18S-rDNS fast völlig, die integrierte rDNS enthält keine Hind III-Schneidestelle. Die Situation in diesem Phagen ist dadurch kompliziert, daß eine Veränderung der Klonierungsphagen-Arme stattgefunden hat.
Der Phage λEM 16/1411 besitzt aber mit mehr als 4,5 kbp vor allem mit 25S-rRNS hybridisierender DNS genügend rDNS, um die 25S-rRNS (ca. 3,8 kbp umfassend), den transkribierten Spacer (ca. 0,9 kbp umfassend, Delseney et al., 1979) und Teile des nicht transkribierten Spacers der rDNS-Repetitionseinheit zu enthalten. Damit ist mit ihm vermutlich die Promotorstruktur eines von Polymerase I transkribierten Gens isoliert und kann für weitere Untersuchungen herangezogen werden.
Die natürliche Lagebeziehung der in beiden rekombinanten Phagen integrierten DNS und der restlichen eingebauten Matthiola-DNS

muß durch Hybridisierung von genomischer Matthiola-DNS mit Teilabschnitten der integrierten Phagen-DNS geklärt werden. Dieses aufwendige Verfahren kann umgangen werden, wenn verhindert wird, daß die zur Klonierung eingesetzte Matthiola-DNS mit sich selbst ligiert. Lehrach und Frischauf (1982) erreichen dies durch Behandlung der zu klonierenden DNS mit alkalischer Phosphatase, eine andere Möglichkeit besteht darin, Fragmente, die kleiner oder gleich groß wie die halbmaximale Klonierungskapazität des Vektors sind, auszuschließen (Zehnbauer und Blattner, 1982). Bei λEMBL 3A betrifft dies Fragmente mit weniger als 12 kbp. Eine Ligation zweier Matthiola-DNS-Fragmente führt dann zu einer DNS, die nicht mehr verpackbar ist.

Da alle bisher untersuchten, rDNS enthaltenden Phagen keinen vollständigen rDNS-Repeat besitzen, die Ligation zweier Matthiola-DNS-Fragmente bei der eingesetzten DNS-Verteilung zwar nicht ausgeschlossen aber unwahrscheinlich ist, muß angenommen werden, daß rDNS von Sau 3A bevorzugt geschnitten wird. Nur wenn die rDNS einen großen Anteil der DNS-Fragmente kleiner 6 kbp ausmacht, ist dieses Ergebnis zu erwarten. Auf eine ungleiche Verteilung der Sau 3A-Schnitte deutet auch hin, daß das 2,1 kbp große, 18S-rRNS-codierende Fragment nur in 2 von 10 Fällen auftritt.

Das Schneidemuster der genomischen rDNS-Sequenzen von Matthiola mit Sal I und Xho I weist erstaunliche Übereinstimmung auf. Es ist wahrscheinlich, daß diese methylierungssensitiven Enzyme einen rDNS-Repeat ausschneiden. Dieser Repeat würde ca. 11 kbp umfassen. Da das gefundene Hind III-Fragment kleiner ist und kaum den nicht transkribierten Spacer enthalten kann (Größe des rRNS-Primärtranskripts bei Pflanzen ca. 6,8 kbp; z.B. Delseney et al., 1979), könnte es sich bei dem Sal I-Repeat um die wirkliche Repetitionseinheit handeln, und die bei Hind III-Abbau der Matthiola-DNS und Hybridisierung mit 18S-rRNS aufleuchtenden Banden von 4,4 und 5,6 kbp könnten die Fragmente des nicht transkribierten Spacers darstellen, die die bei Pflanzen übliche Längenheterogenität zeigten (z.B. Yakura et al., 1983). Klonierung der Sal I-abgebauten DNS im Phagen λEMBL 3A sollte schnell Aufschluß geben. Dies zeigt, wie vielfältig

einsetzbar der Klonierungsphage λEMBL 3A ist.
Die Versuche mit dem Phagen λEMBL 3A haben gezeigt, daß mit diesem Vektor-System die Erstellung einer genomischen DNS-Bibliothek von Matthiola incana im Vergleich zu anderen Vektor-Systemen leicht möglich ist. Werden $4{,}5 \times 10^5$ rekombinante Phagen gebildet, ist mit 99%iger Wahrscheinlichkeit jede DNS-Sequenz des Genoms, also auch die Chalkonsynthase-Gensequenz, in einem Phagen repräsentiert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von Flavonoiden in Pflanzen erfolgt nach zeitlich und räumlich definierten Differenzierungsmustern oder als Antwort auf verschiedene Außenreize. Das Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese ist die Chalkonsynthase; sie liefert das erste Flavonoid-typische Zwischenprodukt der Synthesekette, das Chalkon. Das Chalkonsynthase-Gen wurde deshalb als Beispiel eines Gens gewählt, dessen Strukturaufklärung Hinweise auf Mechanismen der Genaktivierung oder -inaktivierung während der Differenzierung und der Aktivierung von Genen auf Außenreize geben sollte. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen sollte in der vorliegenden Arbeit bestimmt werden, ob eine vorliegende cDNS-Sequenz, die komplementär zur Chalkonsynthase-mRNS aus Petersilie ist - die Insert-DNS der Plasmide pLF 12 und pLF 56 -, zur Identifizierung der Chalkonsynthase-Gensequenz von Matthiola incana herangezogen werden kann. Außerdem sollte ein Klonierungssystem erarbeitet werden, mit dessen Hilfe die Isolierung eines Strukturgens von Matthiola incana möglich wäre.

Hybridisierung von Matthiola-DNS mit Chalkonsynthase-spezifischer cDNS aus Petersilie ergab folgendes Ergebnis:

- Zwischen der Chalkonsynthase-Gensequenz von Matthiola incana und pLF 56-Insert-DNS besteht nur geringe Homologie; dies drückt sich durch Bildung eines DNS/DNS-Hybrids mit niedrigem Schmelzpunkt aus. Bei Southern-Hybridisierung kann keine Bindung der cDNS-Sequenz an Chalkonsynthase-Gensequenzen von Matthiola wahrgenommen werden.
- Matthiola-DNS besitzt DNS-Sequenzen, die homolog zur pBR 322-Plasmid-DNS sind. Sie liefern bei Southern-Hybridisierung deutliche Hybridisierungssignale.
- Versuche, die Hybridisierung von pBR 322-DNS mit Matthiola-DNS auszuschließen (Absättigung mit unmarkierter DNS, Änderung der Hybridisierungsbedingungen, weitere Reinigung der Insert-DNS) hatten keinen Einfluß auf das Hybridisierungsergebnis.
- Da bei Antirrhinum die Identifizierung der Chalkonsynthase-Gensequenz mit pLF 56-Insert-DNS möglich war (Wienand et al.,

1982), wurde das Hybridisierungsverhalten von Antirrhinum-DNS als Vergleich herangezogen. Antirrhinum-DNS geht einerseits mit der cDNS aus pLF 56 eine stabilere Bindung ein als Matthiola-DNS, andererseits zeigt sie bei Hybridisierung mit pBR 322 keine deutliche Reaktion.

Mit der vorliegenden cDNS aus Petersilie ist damit keine Identifizierung der Chalkonsynthase-Gensequenz innerhalb der genomischen DNS von Matthiola incana möglich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß schwache Hybridisierung dieser Sequenz erkennbar wird, wenn die Kreuzreaktion der pBR 322-DNS verhindert wird. Dies kann durch Umklonierung der cDNS in einen anderen Klonierungsvektor getestet werden.

Zwei verschiedene Klonierungsansätze wurden auf ihre Eignung zur Isolierung einer definierten DNS-Sequenz untersucht: Die gezielte Klonierung einer DNS-Sequenz im Plasmidsystem nach Vorselektion bzw. die Erstellung einer "Gesamt-DNS-Bibliothek" im -Phagensystem mit anschließendem "screening".

DNS-Fragmente, die möglicherweise Chalkonsynthase-Gensequenzen enthalten, wurden vor der Klonierung im Plasmid pBR 325 durch Saccharosegradienten-Zentrifugation angereichert. Dieser Ansatz lieferte 50 000-100 000 rekombinante Plasmide, die Matthiola-DNS einer durchschnittlichen Größe von 1-3 kbp integriert hatten. Diese Werte reichen theoretisch zur Isolierung einer spezifischen angereicherten DNS-Sequenz aus. Da keiner der untersuchten Klone die Chalkonsynthase-Gensequenz enthielt, muß angenommen werden, daß diese Sequenz bei der Vorselektion durch Hybridisierung mit pLF 56-DNS nicht erfaßt wurde.

Für die Erstellung einer genomischen DNS-Bibliothek von Matthiola incana (Genomgröße 1,5 pg) wurden verschiedene λ-Phagensysteme als Klonierungsvektoren getestet.

- Zunächst wurden Bedingungen der Präparation von Verpackungsextrakten, der Verpackung in-vitro-ligierter DNS, der In-vitro-Ligation und der Isolierung und Verarbeitung von Phagen-DNS erarbeitet, die eine effiziente Klonierung im Phagensystem erlauben.

- Unter insgesamt ca. 300 000 rekombinanten Phagen, die in den Phagen λgtWES und λNM 762 gebildet wurden, konnte keiner identifiziert werden, der zur pLF 56-Insert-DNS komplementäre Sequenzen enthielt.
- Ein Vergleich verschiedener Klonierungsphagen (λgtWES, λNM 762, λEMBL 3A) ergab, daß der Phage λEMBL 3A für die Klonierung genomischer DNS am besten geeignet ist.
- Unter ca. 150 000 rekombinanten Phagen im Phagensystem λEMBL 3A wurden ungefähr 390 Phagen identifiziert, die ribosomale DNS-Sequenzen enthalten. Zwei dieser Phagen wurden näher charakterisiert. Sie enthalten eventuell einen Bereich des nicht transkribierten Spacers der rDNS und damit möglicherweise eine Promotorstruktur der RNS-Polymerase I.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: The Molecular Biology of the Cell.
Garland Publishing Inc. New York, 1983

Apel, K.: Phytochrom-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (Hordeum vulgare).
Eur. J. Biochem. 97: 183-188 (1979)

Appels, R., Dvořák, J.: The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species.
Theor.Appl. Genet. 63: 337-348 (1982)

Appels, R., Dvořák, J.: Relative rates of divergence of spacer and gene sequence within the rDNA region of species in the Triticae: Implications for homogeneity of repeated gene family.
Theor. Appl. Genet. 63: 361-365 (1982a)

Appelyard, R. K.: Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strains derived from Escherichia coli K12.
Genetics 39: 440-452 (1954)

Arber, W.: DNA modification and restriction.
Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 14: 1-37 (1974)

Arrigo, A. P.: Investigation on the function of the heat shock proteins in Drosophila melanogaster tissue culture cells.
Mol. Gen. Genet. 178: 517-524 (1980)

Banjerji, J., Rusconi, S., Schaffner, W.: Expression of a ß-globin gene is enhanced by remote SV 40 DNA sequences.
Cell 27: 299-308 (1981)

Banjerji, J., Olson, L., Schaffner, W.: A lymphocyte-specific enhancer is located downstream of the joining region of immunoglobulin heavy chain genes.
Cell 33: 729-740 (1983)

Baulcombe, D.: Wheat ∝-amylase genes: cloning of a developmentally regulated gene family.
In: Genetic Engineering, Setlow, J. K., Hollaender, A. (eds.), 93-108
Plenum Press, New York, 1983

Bazarel, M., Helinski, D. R.: Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2, E3 from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 36: 185-194 (1968)

Bedbrook, J. R., Smith, S. M., Ellis, R. J.: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the precursor to the small subunit of chloroplast RuBPCase.
Nature 287: 692-697 (1980)

Beermann, S.: The diminuation of heterochromatic chromosomal segments in Cyclops (Crustacea, Copepoda).
Chromosoma 60: 297-344 (1977)

Bellet, A. J. D., Busse, H. G., Baldwin, R. L.: Tandem genetic duplications in a derivative of phage lambda.
In: The Bacteriphage Lambda, Hersey, A. D. (ed.), 501-514
Cold Spring Harbour Lab., New York, 1971

Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C.: Isolation of multigene families and determination of homologies by filterhybridization methodes.
Meth. Enzym. 100: 266-285 (1983)

Benton, W. D., Davies, R. W.: Screening λgtWES recombinant clones by hybridization to single plaques in situ.
Science 196: 180-182 (1977)

Bird, A. P.: A study of early events in ribosomal gene amplification .
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biology 42: 1179-1183 (1978)

Bishop, J. L.: Cancer genes come of age.
Cell 32: 1018-1020 (1982)

Blattner, F. R., Blechel, A. E., Denniston-Thompson, K., Faber, H. E., Richards, J. E., Slightom, J. L., Tucker, R. W., Smithies, O.: Cloning human fetal γ-globin and α-type globin DNA: preparation and screening of shotgun collections.
Science 202: 1279-1284 (1978)

Bogorad, L., Jolly, S. O., Kidd, G., Link, G., McIntosh, L.: Organization and transcription of maize chloroplast genes.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C. J. (ed.), 291-304
Plenum Press, New York, 1980

Bolivar, F.: Molecular cloning vectors: Derivatives of pBR 322
In: Genetic Engineering, Boyer, H. W., Nicosia, S. (eds.), Vol. 2, 59-64
Elsevier North Holland Biomedical Press, 1978

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Green, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., Falcon, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2: 95-113 (1975)

Bonas, U., Sommer, H., Saedler, H.: The 17 kb Tam 1 element of Antirrhinum majus induces a 3 bp duplication upon integration into chalcone synthase gene.
The EMBO J., 1984, in Druck

Bonner, J. J., Pardue, M. L.: Ecdyson-stimulated RNS synthesis in the imaginal discs of Drosophila melanogaster.
Chromosoma 58: 87-99 (1976)

Borst, P., Cross, G. A. M.: Molecular basis of trypanosome antigenic variation.
Cell 29: 291-303 (1982)

Boyer, H. W., Roulland Dussoix, D. J.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in E. coli.
J. Mol. Biol. 41: 459-472 (1969)

Breathnach, R., Chambon, P.: Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.
Annual Rev. Biochem. 50: 349-383 (1981)

Bremer, W.: Hybridisering van DNA uit Matthiola incana met het E-coli plasmide LF 56.
Studienarbeit, Tübingen, 1983

Britten, R.J., Davidson; E. H.: Gene regulation for higher cells: A theory.
Science 165: 349-357 (1969)

Burr, B., Burr, F. A.: Controlling element events at the shrunken locus in maize.
Genetics 98: 143-156 (1981)

Burr, B., Burr, F. A.: Ds controlling elements of maize at the shrunken locus are large and dissimilar insertions.
Cell 29: 977-986 (1982)

Busslinger, M.: Methylation and the regulation of globin gene expression.
Cell 34: 197-206 (1983)

Clarke, L., Carbon , J.: A colony bank containing Col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome.
Cell 9: 91-99 (1976)

Cleveland, D. W., Lopota, M. A., MacDonold, R. J., Cowan, N. J., Rutter, W. J., Kirschner, M. W: Number and evolutionary conservation of α- and ß-tubulin and cytoplasmic ß- and γ-actin genes using specific cloned cDNA probes.
Cell 20: 95-105 (1980)

Clever, U.: Regulation and chromosome function.
Ann. Rev. Genetics 2: 11-30 (1968)

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2116 (1972)

Conn, E. E.: Secondary Plant Products.
In: The Biochemistry of Plants- A Comprehensive Treatise, Stumpf, P. K., Conn, E. E. (eds.),Vol 7
Academic Press, New York, 1981

Cooper, Ch. D., Crain, W. R.: Complete nucleotide sequence of a sea urchin actin gene.
Nucl. Acids Res. 10: 4081-4091 (1982)

Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P.. Kedinger, C., Chambon, P.: Promotor sequences of eucaryotic protein coding genes.
Science 209: 1406-1414 (1980)

Croy, R. R. D., Lycett, G. W., Gatehouse, J. A., Yarwood, J. N., Boulter, D.: Cloning and analysis of cDNA encoding plant storage genes.
Nature 295: 76-79 (1982)

Dangelmayr, B., Stotz, G., Spribille, R., Forkmann, G.: Relationship between flower development anthocyanin accumulation and activity of enzymes involved in flavonoid biosynthesis in Matthiola incana R. Br.
Z. Naturforschung 38c: 551-555 (1983)

Davidson, E. H., Hough, B. R., Amenson, C. S., Britten, R. J.: General interspersion of repetitive with non-repetitive sequence elements in DNA of Xenopus.
J. Mol. Biol. 77: 1-23 (1973)

Davidson, E. H., Britten, J. R.: Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences.
Science 204: 1052-1059 (1979)

Delseney, M., Aspart, L., Cooke, R., Grellet, F. M., Penon, P.: Restriction analysis of radish nuclear genes for rRNA: Evidence for heterogeneity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 91: 540-547 (1979)

Denhardt, D. T.: A membrane filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 641-646 (1966)

Deumling, B.: Sequence arrangement of a highly methylated satellite DNA of a plant, Scilla: A tandemly repeated inverted repeat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 338-342 (1981)

DiDomenico, B.J.: The heat shock response is selfregulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels.
Cell 31: 593-603 (1982)

Döring, H. P., Tillmann, E., Starlinger, P.: DNA sequence of the maize transposable element Dissociation.
Nature 307: 127-130 (1984)

Döring, H.P., Freeling, M., Hake, S., Johns, M. A., Kunze, R., Merckelbach, A., Salamini, F., Starlinger, P.: A Ds-mutation of the Adh1 gene in Zea mays L.
Mol. Gen. Genet. 193: 199-204 (1984)

Duell-Pfaff, N., Wellmann, E.: Involvement of phytochrome and blue light photoreceptor in UV-B influenced flavonoid synthesis in parsley (Petrolselinum hortense Hoffm.) cell suspension cultures.
Planta 150: 213-217 (1982)

Dugaiczyk , A., Boyer, H. W., Goodman, H. M: Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures.
J. Mol. Biol. 96: 171-184 (1975)

Durcia, D. S., Schloss, J. A., Crain, W. R.: Organization of actin gene sequences in the sea urchin: Molecular cloning of an intron-containing DNA sequence coding for a cytoplasmatic actin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5683-5687 (1980)

Elgin, S. C. R.: DNase I hypersensitive sites of chromatin
Cell 27: 413-415 (1981)

Evans, M. T., Hager, L. J., McKnight, G. S.: A somatomedin-like peptide hormone is required during estrogen-mediated induction of ovalbumin gene transcription.
Cell 25: 187-193 (1981)

Fedoroff, N., Mauvais, J., Chaleff, D.: Molecular studies on mutations at the shrunken locus in maize caused by the controlling element DS.
J. Mol. Appl. Genet. 2: 11-29 (1983)

Felsenfeld, G., McGhee, I.: Methylation and gene control.
Nature 296: 602-603 (1982)

Fischer, R. L., Goldberg, R. B.: Structure and flanking regions of soybean seed protein genes.
Cell 29: 651-660 (1982)

Flavell, R. B.: The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences.
Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 569-596 (1980)

Forkmann, G.: Precursors and genetic control of anthocyanin synthesis in Matthiola incana R.Br.
Planta 137: 159-163 (1977)

Forkmann, G.: The B-ring hydroxylation pattern of intermediates of anthocyanin-synthesis in pelargonidin and cyanidin-producing lines of Matthiola incana.
Planta 148: 157-161 (1980)

Frey, M.: Untersuchungen zur Aufnahme und Identifizierung von Plasmid-DNS in Lemna perpusilla.
Diplomarbeit, Tübingen, 1980

Friedrich, H. H., Hemleben, V., Key, J.: Restriction mapping of ribosomal RNA genes of higher plants.
In: Genome and Chromatin: Organization, Evolution and Function,Nagl, W., Hemleben, V., Ehrendorfer, F. (eds.)
Plant Syst. Evol., Suppl. 2, 73-88
Springer Verlag, Wien, New York, 1979

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N.: Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences.
J. Mol. Biol.: 170: 827-842 (1983)

Fyrberg, E. A., Kindle, K. L., Davidson, N., Sodja, A.: The actin genes of Drosophila: A dispersed multigene family.
Cell 19: 365-378 (1980)

Galli, G., Hofstetter, H., Birnstiel, M. L.: Two conserved sequence blocks within eucaryotic tRNA genes are major promotor elements.
Nature 294: 626-631 (1981)

Ganal, M.: Diplomarbeit, Tübingen, 1984, in Vorbereitung

Garel, A., Zolau, M., Axel, R.: Genes transcribed at diverse rates have a similar conformation in chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4867-4871 (1977)

Geiser, M., Weck, E., Döring, H. P., Werr, W., Courage-Tebbe, U.. Tillmann, E., Starlinger, P.: Genomic clones of wild type allel and a transposable element-induced mutant allel of the sucrose synthase gene of Zea mays.
The EMBO J. 1: 1455-1460 (1983)

Gerlach, W. L., Bedbrook, J. R.: Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley.
Nuc. Acids Res. 7: 1869-1885 (1979)

Gerlach, W. L., Pryor, A. J., Dennis, E. S., Ferl, F. J., Sachs, M. M., Peacock, W. J.: cDNA cloning and induction of the alcoholdehydrogenase gene (Adh1) of maize.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2981-2985 (1982)

Gerstner, J.: Restriktionskartierung der Gene für 18 S- und 25 S-ribosomale RNS aus Phaseolus aureus (Roxb.).
Diplomarbeit, Tübingen, 1983

Gillies, S. D., Morrison, S. L., Oi, V. T., Tonegawa, S.: A tissue specific transcription enhancer is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain.
Cell 33: 717-728 (1983)

Goldberg, R. B., Hoschek, G., Kamalay, J.C., Timberlake, W. E.: Sequence complexity of nuclear and polysomal RNA in leaves of tobacco plants.
Cell 14: 123-131 (1978)

Goldberg, R. B., Hoschek, G., Vodkin, L. O.: An insertion sequence blocks the expression of a soybean lectin gene.
Cell 33: 465-475 (1983)

Gollmer, I., Apel, K.: The phytochrom-controlled accumulation of mRNA sequences encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (Hordeum vulgare).
Eur. J. Biochem. 133: 309-313 (1983)

Grierson, D.: RNA processing and other posttranscriptional modifications.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants II,Boulter, D., Parthier, B. (eds.),
Springer Berlin,Heidelberg, New York, 1983

Grierson, D., Hemleben, V.: Ribonucleic acid from the higher plant Matthiola incana. Molecular weight measurements and DNA/RNA hybridization studies.
Biochim. Biophys. Acta 475: 424-436 (1977)

Griffin-Shea, R., Thireos, G., Kafatos, F. C., Petri, W. H., Villa-Kamaroff, L.: Chorion cDNA clones of D. melanogaster and their use in studies of sequence homology and chromosomal location in the chorion genes.
Cell 19: 915-922 (1980)

Grisebach, H., Barz, W.: Biochemie der Flavonoide.
Naturwiss. 56: 538-544 (1969)

Gruenbaum, Y., Cedar, H., Razin, A,: Substrat and sequence specifity of a eucaryotic DNA methylase.
Nature 295: 620-622 (1982)

Grunstein, M., Hogness, D. S.: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965 (1975)

Gupta, P., Rosen, J. M., D'Eustachio, P., Ruddle, F. H.: Localization of a casein gene family to a single mouse chromosome.
J. Cell Biol. 93: 199-204 (1982)

Gupta, M., Bertram, I., Shepherd, N. S., Saedler, H.: Cin 1, a family of dispersed repetitive elements in Zea mays.
Mol. Gen. Genet. 192: 373-377 (1983)

Gupta, M., Shepherd, N. S., Bertram, I., Saedler, H.: Repetitive sequences and their organization on genomic clones of Zea mays.
The EMBO J. 3: 133-139 (1984)

Hahlbrock, K., Sutter, A., Wellmann, E., Ortmann, R., Grisebach,H.: Relationship between organ development and activity of enzymes involved in flavone glycoside biosynthesis in young parsley plants.
Phytochemistry 10: 109-116 (1971)

Hahlbrock, K.: The flavonoids.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P. K., Conn, E. E. (eds.), Vol 7, 425-456
Academic Press, New York 1981

Hahlbrock, K., Grisebach, H.; Enzymic controls in the synthesis of lignin and flavonoids.
Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 105-130 (1979)

Hahlbrock, K., Wellmann, E.: Light-dependent induction of enzymes related to phenylpropanoid metabolism in cell suspension cultures from parsley.
Bioch. Biophys. Acta 304: 702-703 (1973)

Hahlbrock, K., Knobloch, K.-H., Kreuzaler, F., Potts, I. R. M., Wellmann, E.: Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interregulated enzymes.
Eur. J. Biochem. 61: 199-206 (1976)

Hahlbrock, K., Schröder, J., Vieregge, J.: Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures.
In: Advances in Biochemical Engineering , Fiechter, A. (ed.), Vol 18: Plant Cell Cultures II, 39-60,
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980

Hahlbrock, K., Lamb, C., Purwin, C., Ebel, J., Fautz, E., Schäfer, E.: Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from Phytophtera megasperma var. sojae. Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism.
Plant Physiol. 67: 768-773 (1981)

Hall, L., Davies, M. S., Craig, R. K., : The construction , identification and characterization of plasmids containing human α-lactalbumin cDNA sequences.
Nucl. Acids Res. 9: 65-84 (1981)

Harbers, K., Schnieke, A., Stuhlmann, H., Jähner, D., Jaenisch, R.: DNA methylation and the gene expression: Endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 78: 7609-7613 (1981)

Heller, W., Hahlbrock, K.: Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone.
Arch. Biochem. Biophys. 200: 617-619 (1980)

Hemleben, V.: Anthocyanin carrying structures in specific genotypes of Matthiola incana R.Br.
Z. Naturforschung 36c: 925-927 (1981)

Hemleben, V., Leweke, B., Roth, A., Stadler, J.: Organization of highly repetitive satellite DNA from two Cucurbitaceae species (Cucumis melo and Cucumis sativus).
Nucl. Acids Res. 10: 631-644 (1982)

Hemleben, V., Frey, M., Rall, S., Koch, M., Kittel, M., Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Hahlbrock, K.: Studies on the chalcone synthase gene of two higher plants: Petroselinum hortense and Matthiola incana.
In: Embryonic Development Part B: Cellular Aspects, Burger, M. M., Weber, R., (eds.), 555-566
Alan R. Liss, New York, 1982a

Hentschel, C.C., Birnstiel, M. L.: The organization and expression of histone gene families.
Cell 25: 301-313 (1981)

Hille, A., Purwin, C., Ebel, J.: Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in cultured soybean cells by elicitor from Phytophtera megasperma f. sp. glycinea.
Plant Cell Reports 1: 123-127(1982)

Hohn, B.: In vitro packaging of λ and cosmid DNA.
Meth.Enzym. 68: 299-309 (1979)

Hohn, B., Murray, K.: Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro.
Biochemistry 74: 3259-3263 (1977)

Huez, G., Bruck, C., Cleuter, Y.: Translational stability of native and deadenylated rabbit mRNA injected into HeLa cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 908-911 (1981)

Hylding-Nielsen, J. J., Jensen, E. Ø., Paludom, K., Wiborg, O., Garrett, R., Jørgensen, P., Morcher, K. A.: The primary structure of two leghaemoglobin genes from soybean.
Nucl. Acids Res. 10: 689-701 (1982)

Jähner, D., Stuhlmann, H., Steward, C. D., Harbers, K., Löhler, J., Simon, I., Jaenisch, R.: De novo methylation of retroviral genomes during mouse embryogenesis.
Nature 298: 623-628 (1982)

Jantzen, C.:Untersuchungen zur Transkription der Chalkonsynthase-messenger-RNA während der Blütenentwicklung verschiedener Linien von Matthiola incana R.Br.
Diplomarbeit, Tübingen, 1983

Jeffreys, A. J., Flavell, R. A.: A physical map of the DNA regions flanking the rabbit ß-globin gene.
Cell 12: 429-439 (1977)

Kamalay, J. C., Goldberg, R. B.: Regulation of structural gene expression in tobacco.
Cell 19: 935-946 (1980)

Karch, F., Töröck, I., Tissieres, A.: Extensives regions of homology in front of the two heat shock variant genes in Drosophila melanogaster.
J. Mol. Biol. 148: 219-230 (1981)

Kittel, M.: Isolierung und Charakterisierung stadienspezifischer Messenger-RNA aus Matthiola incana (Brassicaceae). Diplomarbeit Tübingen, 1981

Klipp, W.: Restriktions- und Dichteanalyse eines Plasmids (pRD 1) mit der Genregion für N_2-Fixierung aus Klebsiella pneumoniae. Diplomarbeit Erlangen, 1978

Koch, M.: Untersuchungen zur Charakterisierung und Klonierung des Chalkonsynthase-Gens von Matthiola incana (Brassicaceae). Diplomarbeit Tübingen, 1982

Kreuzaler, F., Hahlbrock, K.: Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetat units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell suspension cultures of Petroselinum hortense.
Eur. J. Biochem. 56: 205-213 (1975)

Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Hammer, D., Hahlbrock, K.: Flavanone synthase from Petroselinum hortense. Molecularweight, subunit composition, size of messenger RNA and absence of pantetheinyl residue.
Eur. J. Biochem. 99: 89-96 (1979)

Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D. N., Hahlbrock, K.: UV induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of Petroselinum hortense.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2591-2593 (1983)

Krüger, C., Benecke, B.-J.: In vitro translation of Drosophila heat-shock and non-heat-shock mRNAs in heterologous and homologous cell-free systems.
Cell 23: 595-603 (1981)

Kuhn, B., Forkmann, G., Seyffert, W.: Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in Callistephus chinensis.
Planta 138: 199-203 (1978)

Kuo, M. T., Mandel, J. L., Chambon, P.: DNA methylation: Correlation with DNase I sensitivity of chicken ovalbumin chromatin.
Nucl. Acids Res. 7: 2105-2113 (1979)

Kushner, P. J., Blair, L. C., Herskowitz, I.: Control of yeast cell types by mobile genes, a test.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5264-5268 (1979)

Larsen, A., Weintraub, H.: An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin.
Cell 31: 609-622 (1982)

Leaver, C. J., Forde, B. G.: Mitochondrial genome expression in higher plants.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C. J. (ed.), 407-425
Plenum Press, New York, 1980

Lawton, M. A., Dixon, R. A., Hahlbrock, K., Lamb, C.: Elicitor induction of mRNA activity. Rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells.
Eur. J. Biochem. 130: 131-139 (1983)

Lawton, M. A., Dixon, R. A., Hahlbrock, K., Lamb, C.: Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells.
Eur. J. Biochem. 129: 593-601 (1983a)

Leber, B., Hemleben, V.: Structure of plant nuclear and ribosomal DNA containing chromatin.
Nucl. Acids Res. 7: 1263-1281 (1979)

Lehrach, H., Frischauf, A.-M.: Lab manual, F 6: Phage libraries.
EMBO-Labor Heidelberg, 1982

Lerner, M. R., Steitz, J. A.: Snurps and scyrps.
Cell 25: 298-300 (1981)

Levinson, B., Khoury, G., Vande Woude, G., Gruss, P.: Activation of SV 40 genome by 72-base pair tandem repeats of moloney sarcoma virus.
Nature 295: 568-572 (1982)

Leweke, B., Hemleben, V.: Organization of rDNA in chromatin: Plants.
In: The Cell Nucleus, vol. XI: rDNA, Part B, Busch, H., Rothblum, C. (eds.), 225-253
Academic Press, New York, 1982

Li, C. H.: ß-Endrophin.
Cell 31: 504-505 (1982)

Lindberg, U., Persson, T.: Isolation of mRNA from KB-cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to sepharose.
Eur. J. Biochem. 31: 246-254 (1972)

Mandel, J. L., Chambon, P.: DNA methylation: Organspecific variations in the methylation pattern anc among ovalbumin and other chicken genes.
Nucl. Acids Res. 7: 2081-2103 (1979)

Maniatis, T.: Molecular cloning: A laboratory manual.
Maniatis, T., Fritsch, G. F., Sambrook, J. (eds.)
Cold Spring Harbour: CSH Laboratory, 1982

Maniatis, T., Jeffrey, A., Kleid, D. G.: Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1184-1188 (1975)

Maniatis, T., Hardison, R. C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sin, G. K., Efstratiadis, A.: The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15: 687-701 (1978)

Matile, P.: Protein degradation.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 169-188
Springer, Berlin, Heidelberg (1982)

Mathis, D., Oudet, P., Chambon, P.: Structure of transcribing chromatin.
In: Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 24, Cohn, E. W. (ed.), 2-55 (1980)

Maxam, A. W., Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564 (1977)

McGhee, J. D., Felsenfeld, G.: An other potential artefact in the study of nucleosome chromatin digestion with micrococcal nuclease.
Cell 32: 597-598 (1983)

McGhee, J. D., Wood, W. J., Dolan, M., Engel, J. D., Felsenfeld, G.: A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult ß-globin gene is accessible to nuclease digestion.
Cell 27: 45-55 (1981)

McKeon, C., Ohokubo, H., Pastan, I., Crombrugghe, B.: Unusual methylation pattern of collagen gene.
Cell 29: 203-210 (1982)

Mehdy, M. C., Rutner, D., Firtel, R. A.: Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in Dictyostelium.
Cell 32: 763-771 (1983)

Mol, N. M., Schram, A. W., Vlaming, de, O., Gerats, A. G. M., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., Reif, H. J., Veltkamp, E.: Regulation of flavonoid gene expression in Petunia hybrida: Description and partial characterization of a conditional mutant in the chalcone synthase gene expression.
Mol. Gen. Genet. 192: 424-429 (1983)

Mohr, H.: Phytochrome and Gene Expression.
In: Cell Compartimentation and Metabolic Channeling, Nover, L., Lynen, F., Mothes, K. (eds.)
G. Fischer, Jena, und Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1980

Murray, N. E., Brammar, W. J., Murray, M. K.: Lambdoid phages that simplyfy the recovery of in vitro recombinants.
Mol. Gen. Genet. 150: 53-61 (1977)

Nagl, W.: Zellkern und Zellzyklen.
E. Ulmer, Stuttgart, 1976

Noll, M., Kornberg, R. D.: Action of micrococcal nuclease on chromatin and location of histone H1.
J. Mol. Biol. 109: 393-404 (1977)

Page, G. S., Smith, S., Goodman, H. M.: DNA sequence of the rat growth hormone gene: Location of the 5'-terminus of the growth hormone mRNA and identification of an internal transposon like element.
Nucl. Acids Res. 9: 2087-2104 (1981)

Panopoulos, N. J. (ed.): Genetic engineering in the plant sciences.
Praeger, New York, 1981

Peacock, W. J., Dennis, E. S., Gerlach, W. L., Llewellyn, H., Lörz, H., Pryor, A. J., Sachs, M. M., Schwartz, D., Sutton, W. D.: Gene transfer in maize: Controlling elements and the alcohol-dehydrogenase gene.
Proc. Miami Winter Symp., Academic Press, New York, 1983 (im Druck)

Pedersen, K., Devereux, J., Wilson, D. R., Sheldon, E., Larkins, B. A.: Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related zein genes in maize.
Cell 29: 1015-1026 (1982)

Queen, C., Baltimore, D.: Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements.
Cell 33: 741-748 (1983)

Rafalski, J. A., Wiewirówski, M., Söll, D.: Organization of ribosomal DNA in yellow lupine (Lupinus luteus) and sequence of the 5,8S RNA gene.
FEBS Letters 152: 241-246 (1983)

Ragg, H., Kuhn, D. N., Hahlbrock, K.: Coordinated regulation of 4-coumarate: CoA ligase and phenylalanine ammonia-lyase mRNAs in cultured plant cells.
J. Biol. Chem. 256: 10061-10065 (1981)

Rall, S.: Charakterisierung von Anthocyanen und den Enzymen Phenylalanin-Ammonium-Lyase und Chalkonsynthase in verschiedenen Entwicklungsstadien definierter Genotypen von Matthiola incana R. Br.
Dissertation Tübingen, 1983

Rall, S., Hemleben, V.: Characterization and expression of chalcone synthase in different genotypes of Matthiola incana R. Br. during flower development.
Plant Mol. Biol. (1984) eingereicht

Razin, A., Riggs, A. D.: DNA methylation and gene function.
Science 210: 604-610 (1980)

Reimold, U., Kröger, M., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K.: Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. The EMBO Journal 2: 1801-1805 (1983)

Richter, R. F., Nover, L.: Determination and function of the immune system.
In: Cell Differentiation, Nover, L., Luckner, M., Parthier, B. (eds.), 449-475
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1981

Ritossa, F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila.
Experimenta 18: 571-573 (1962)

Rogers, I., Wall, R.: A mechanism for RNA splicing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1877-1879 (1980)

Rosenberg, M., Court, D.: Regulatory sequences involved in promotion and termination of RNA transcription.
Ann. Rev. Genet. 13: 319-353 (1979)

Saedler, H., Bonas, U., Deumling, B., Gupta, M., Hahlbrock, K., Harrison, B. J., Kreuzaler, F., Peterson, P. A., Reif, J., Schwarz-Sommer, Z., Shepherd, N. S., Sommer, H., Ubben, D., Wienand, U.: Transposable elements in plants.
In: Chater, K. F., Cullis, C. A., Hopwood, D. A., Johnston, A. W. B., Woolhouse, H. W. (eds.), Genetic Rearrangement, The Fifth John Innes Symposium.
Croom Helm Ltd. London, Canberra, 1983

Sandee, G., Wood, W. I., Felsenfeld, G.: Interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes.
Nucl. Acids Res. 8: 3757-3778 (1981)

Sanger, F., Coulson, A. R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.
J. Mol. Biol. 94: 441-448 (1977)

Savakis, C., Demetri, G., Cherbas, P.: Ecdysteroid inducible polypeptides in a Drosophila line.
Cell 22: 665-674 (1980)

Schaffner, W., Gross, K., Telford, J., Birnstiel, M. L.: Molecular analysis of the histone gene cluster of Psammechinus militaris: II. The arrangement of five histone coding and spacer sequences.
Cell 8: 471-478 (1976)

Schaffner, W., Kunz, G., Daefwyler, H., Telford, J., Smith, H. O., Birnstiel, M. L.: Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analyzed by sequencing.
Cell 14: 655-671 (1978)

Schiebel, K.:
Diplomarbeit Tübingen, 1984, in Vorbereitung

Schimke, R. T.: Gene amplification and drug resistance.
Scientific American 243: 60-69 (1980)

Schöffl, F., Key, J. L.: Identification of a multigene family for small heatshock proteins in soybean and physical characterization of one individual gene coding region.
Plant Mol. Biol. 2: 269-278 (1983)

Schröder, J., Kreuzaler, F., Schäfer, E., Hahlbrock, K.: Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNA in irradiated plant cells.
J. Biol. Chem. 254: 57-65 (1979)

Schuler, M. A., Schmidt, E. S., Beachy, R. N.: Closely related families of genes code for the α and α' subunits of the soybean 7S storage protein.
Nucl. Acids Res. 10: 8225-8243 (1982)

Schuler, M. A., Doyle, J. J., Beachy, R. N.: Nucleotide homologies between the glycosylated seed storage proteins of Glycine max and Phaseolus vulgaris.
Plant Mol. Biol. 2: 119-127 (1983)

Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wienand, U., Peterson, P. A., Saedler, H.: The Spm (En) transposable element controls the excision of a 2 kb DNA at the wx^{m-8} locus of Zea mays.
The EMBO Journal (1984), im Druck

Serfling, E.: Stuktur und Expression der Gene höherer Organismen.
G. Fischer, Jena, 1982

Seyffert, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje Matthiola incana.
Z. Pflanzenzüchtung 44: 4-29 (1960)

Seyffert, W.: Genetische Untersuchungen an Matthiola incana.
I. Genlokalisation bei Koppelung mit einem Letalfaktor und Interaktion mit einem frei spaltenden Gen.
Biol. Zentralblatt 81: 253-266 (1962)

Seyffert, W.: Simulation of quantitative characters by genes with biologically defined action. II. The material.
Theor. Appl. Genet. 41: 285-291 (1971)

Seyffert, W.: Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide.
Biol. Zbl. 101: 465-483 (1982)

Shah, D. M., Hightower, R. C., Meagher, R. B.: Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1022-1026 (1982)

Shah, D. M., Hightower, R. C., Meagher, R. B.: Genes encoding actin in higher plants:Intron positions are highly conserved but the coding sequences are not.
J. Mol. Appl. Genet. 2: 111-126 (1983)

Shepherd, N. S., Schwarz-Sommer, Z., Wienand, U., Sommer, H., Deumling, B., Peterson, P. A., Saedler, H.: Cloning of a genomic fragment carrying the insertion element Cin1 of Zea mays.
Mol. Gen. Genet. 288: 266-271 (1982)

Sheppard, H. W., Gutman, G. A.: Allelic forms of rat κ-chain genes: Evidence for strong selection at the level of nucleotide sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7064-7068 (1981)

Sheldon, E.: Isolation and analysis of a genomic clone encoding sucrose synthase in maize: Evidence for two introns in Sh.
Mol. Gen. Genet. 190: 421-428 (1983)

Shure, M., Wessler, S., Fedoroff, N.: Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize.
Cell 35: 225-233 (1983)

Singer, M. F.: SINES and LINES: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes.
Cell 28: 433-434 (1982)

Simeck, M., Ziegenmeyer, J., Heckman, J., Rajbandary, U. L.: Absence of the sequence G-TΨCG(A) in several eucaryotic cytoplasmic initiator transfer RNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1041-1045 (1973)

Smith, G. R.: DNA supercoiling: Another level for regulating gene expression.
Cell 24: 599-600 (1981)

Smith, S. M., Bedbrook, J., Speirs, J.: Characterization of three cDNA clones encoding different mRNAs for the precursor to the small subunit of wheat ribulosebiphosphate carboxylase.
Nucl. Acids Res. 11: 8714-8721 (1983)

Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 90: 503-517 (1975)

Spradling, A. C., Mahowald, A. P.: Messenger RNA in heat shocked Drosophila cells.
J. Mol. Biol. 109: 559-587 (1977)

Spradling, A. C., Mahowald, A. P.: Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in Drosophila melanogaster.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1096-1100 (1980)

Spribille, R.: Nachweis und Charakterisierung der Chalkonsynthase unter Verwendung definierter Genotypen höherer Pflanzen.
Dissertation. Tübingen, 1982

Spribille, R., Forkmann, G.: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Matthiola incana R. Br.
Z. Naturforschung 36c: 619-624 (1981)

Spribille, R., Forkmann, G.: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Antirrhinum majus.
Phytochem. 21: 2231- 2234 (1982)

Sternberg, N., Tiemeier, D., Enquist, L.: In vitro packaging of a λDam vector containing Eco RI fragments of Escherichia coli and phage P1.
Gene 1: 255-280 (1977)

Stori, R. V., Scott, M. P., Rich, A., Pardue, M. L.: Translation control of protein synthesis in response to heat shock in Drosophila melanogaster cells.
Cell 22: 825-834 (1980)

Strickberger, M. W.: Genetics.
McMillan, New York, 2. Auflage 1976

Strommer, J. W., Hake, S., Bennetzen, J., Taylor, W. C., Freeling, M.: Regulatory mutants of the Adh1 gene caused by DNA insertions.
Nature 300: 542-544 (1982)

Stubbe, H.: Die Gene von Antirrhinum majus IV.
Z. f. indukt. Abstamm.- u. Vererbungsl. 79: 401-443 (1941)

Sütfeld, O., Wiermann, R.: The occurance of two distinct SAM: 3,4-dihydricphenol 3-O-methyltransferases in tulip anthers.
Bioch. Physiol. Pflanz. 172: 111-123 (1978)

Sun, S. M., Slighton, J. L., Hall, T. C.: Intervening sequences in a plant gene - comparison of the partial sequence of cDNA and genomic DNA of the french bean phaseolin.
Nature 289: 37-41 (1981)

Tabata, T., Sasaki, K., Iwabuchi, M.: The structural organization and DNA sequence of a wheat histone H4 gene.
Nucl. Acids Res. 11: 5865-5875 (1983)

Thibodeau, St., N., Palmiter, R. D., Walsh, K. A.: Precursor of egg white ovomucoid. Aminoacid sequence of an NH_2 terminal extension.
J. Biol. Chem. 253: 9018-9023 (1978)

Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Polsky, F., Edgell, M. H., Seidman, J. G., Leder, A., Enquist, L. W., Norman, B., Leder, P.: Cloning specific segments of the mammalian genome: Bacteriophage λ containing mouse globin and surrounding gene sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4406-4410 (1977)

Wahl, G. M., Stern, M., Stark, G. R.: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenyloxymethyl paper and rapid hybridization using dextran sulfate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3693-3687 (1979)

Wasylyk, B., Kedinger, C., Corden, J., Brison, O., Chambon, P.: Specific in vitro initiation of transcription of conalbumin and ovalbumin genes and comparision with adenovirus-2 early and late genes.
Nature 285: 367-373 (1980)

Wasylyk, B., Wasylyk, P., Augereau, Chambon, P.: The SV 40 72 bp repeat preferentially potentates transcription starting from proximal natural or substitute promoter elements.
Cell 32: 503-514 (1983)

Weintraub, H.: A dominant role for DNA secondary structure in forming hypersensitive structures in chromatin.
Cell 32: 1191-1203 (1983)

Weintraub, H., Groudine, M.: Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation.
Science 193: 848-856 (1976)

Weisbrod, S.: Active chromatin.
Nature 297: 289-295 (1982)

Weisbrod, S., Groudine, M., Weintraub, H.: Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes.
Cell 19: 289-301 (1980)

Wellmann, E., Schopfer, P.: Phytochrome mediated de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in cell suspension cultures of parsley.
Plant Physiol. 55: 822-827 (1975)

Wensink, P. C., Finnegan, D. J., Donelson, J. E., Hogness, D. S.: A system for mapping sequences in the chromosomes in Drosophila melanogaster.
Cell 3: 315-325 (1974)

Wenzel, W., Hemleben, V.: A comparative study of genomes in angiosperms.
Plant Syst. Evol. 139: 209-227 (1982)

Wenzel, W., Hemleben, V.: DNA sequence organization and RNA complexity in Matthiola incana (Brassicaceae).
Plant Syst. Evol. 140: 75-86 (1982a)

Wienand, U., Langridge, P., Feix, G.: Isolation and characterization of a genomic sequence of maize coding for a zein gene.
Mol. Gen. Genet. 182: 440-444 (1981)

Wienand, U., Sommer, H., Schwarz, Z., Shepherd, N., Saedler, H., Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Hahlbrock, K., Harrison, B., Peterson, P. A.: A general method to identify plant structural genes among genomic DNA clones using transposable element induced mutations.
Mol. Gen. Genet. 187: 195-202 (1982)

Wiermann, R.: Secondary plant products and cell and tissue differentation.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P. K., Conn, E. E. (eds.), 85-116
Academic Press, New York, 1981

Wigler, M., Levy, D., Perucho, M.: The somatic replication of DNA methylation.
Cell 24: 33-40 (1981)

Wilson, J. T., Wilson, L. B., DeRiel, J. K., Villa Kamaroff, L., Efstratiadis, A., Forget, B. G., Weissman, S. M.: Insertion of synthetic copies of human globin genes into bacterial plasmids.
Nucl. Acids Res. 5: 563-581 (1978)

Woo, S. L., Dugaiczyk, A., Tsai, M. J., Lai, E. C., Catterall, J. F., O'Malley, B. W.: The ovalbumin gene: Cloning of the natural gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3688-3692 (1978)

Wu, J. R., Hurn, J., Bonner, J.: Size and distribution of repetitive segments of the Drosophila genome.
J. Mol. Biol. 64: 211-219 (1972)

Yakura, K., Kato, A., Tanifuji, S.: Structural organization of ribosomal DNA in four Trillium species and Paris verticillata.
Plant & Cell Physiol. 24 (7): 1231-1240 (1983)

Yamamoto, K. R., Alberts, B.: Steroid receptors: Elements for modulation of eucaryotic transcription.
Annu. Rev. Biochem. 45: 721-746 (1976)

Zachau, H. G., Igo-Kemenes, T.: Face to phase with nucleosomes.
Cell 24: 597-598 (1981)

Zähringer, U., Ebel, J., Grisebach, H.: Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Elicitor-induced increases in enzyme activities of flavonoid biosynthesis and mevalonate into glyceollin.
Arch. Biochem. Biophys. 188: 450-455 (1978)

Zieve, G. W.: Two groups of small stable RNAs.
Cell 25: 296-297 (1981)

Zimmerman, J. L., Petri, W., Meselson, M.: Accumulation of a specific subset of Drosophila melanogaster heat shock mRNAs in normal development without heatshock.
Cell 32: 1161-1170 (1983)

Lebenslauf

Name:	Frey, Monika Anna
Geboren:	21. 9. 1955 in Tübingen
Eltern:	Frey, Friedrich
	Frey, Henriette, geb. Frehrking

Schulausbildung

1962-1966	Volksschule Öschingen
1966-1971	Friedrich List-Realschule in Mössingen
	Abschlußzeugnis der Realschule am 10. 7. 1971
1971-1974	Keplergymnasium Tübingen
	Abitur am 28. 5. 1974

Studium

1974-1977	Studium der Biologie und Mathematik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1976	Vordiplomprüfung in Biologie und Zwischenprüfung in Mathematik
1977-1979	Studium der Biologie
1979	Diplomprüfung Biologie
1979-1980	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, unter Anleitung von Frau Prof. Dr. V. Hemleben Thema: Untersuchungen zur Aufnahme und Identifizierung von Plasmid-DNS in Lemna perpusilla
1980-1984	Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, unter Anleitung von Frau Prof. Dr. V. Hemleben
1980-1984	Wissenschaftliche Hilfskraft bzw. wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Genetik

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann
Betsch
Biessmann
Braun
Breitsprecher
Bunke
Engels
Frank
Gaude
Guglielmi
Hager
Handke
Hemleben
Höltje
Jung
Lange
Lorenz
Mecke
Meyer
Oberwinkler
Pelling
Rähle
Riecker
Schlote
Schönhage
Schwemmle
Seyffert
Sperlich
Strähle
Wöhrmann
Zähner

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353